



**Sandra Cristina
Ferraz Peixoto**

**Demência frontotemporal: diagnóstico molecular em doentes
portugueses**

**Frontotemporal dementia: molecular diagnosis in
Portuguese patients**



**Sandra Cristina
Ferraz Peixoto**

**Demência frontotemporal: diagnóstico molecular em doentes
portugueses**

Frontotemporal dementia: molecular diagnosis in Portuguese patients

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biomedicina Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Sequeiros, Professor catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade de Aveiro, e da Doutora Odete Cruz e Silva, Professora auxiliar com agregação da Secção Autónoma das Ciências de Saúde da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutora Ana Gabriela Henriques
professora auxiliar convidada da Secção Autónoma das Ciências Saúde da
Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Carolina Lemos
professora auxiliar convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
da Universidade do Porto

Prof. Doutor Jorge Sequeiros
professor catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da
Universidade do Porto

Prof. Doutora Odete Cruz e Silva
professora auxiliar com agregação da Secção Autónoma das Ciências de
Saúde da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao orientador Professor Jorge Sequeiros por me ter dado toda a flexibilidade do horário de trabalho de forma a conseguir frequentar este mestrado, por me ter dado a oportunidade de desenvolver este trabalho no seu laboratório. Por todo o apoio e compreensão especialmente na reta final.

À co-orientadora Professora Odete Cruz e Silva por todo o apoio e compreensão especialmente na reta final.

À Dr^a Joana Cerqueira e à Dr^a Ana Margarida Lopes pela orientação laboratorial.

Aos anteriores e actuais geneticistas moleculares do CGPP, IBMC por serem sempre prestáveis.

À doutora Isabel Alonso pela disponibilidade prestada.

Aos restantes colaboradores do CGPP, IBMC, equipa do secretariado clínico, informática e clínica, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Luís, ex-colega de secretária, mas para sempre um grande amigo, e à sua esposa Teresa, obrigada a ambos pela amizade, e apoio incondicional e constante mesmo nos momentos mais difíceis.

Por fim, aos meus avós e à minha mãe por tudo.

palavras-chave

Demência frontotemporal, DFT, degenerescência frontotemporal, DFTL, *MAPT*, *GRN*, *VCP*.

resumo

A demência frontotemporal (DFT) é a segunda forma mais comum de demência em pessoas com mais de 65 anos. A DFT é uma doença autossómica dominante, causada por atrofia cerebral frontotemporal, englobando um grupo heterogéneo de doenças neurodegenerativas, esporádicas ou familiares. A apresentação típica é uma alteração da personalidade e do comportamento social, e disfunção da linguagem. Pode ainda surgir associada a um quadro parkinsoniano ou a esclerose lateral amiotrófica (ELA-DFT). Atualmente foram já implicados 5 *loci*. Até ao momento, estão apenas descritos na literatura 8 doentes portugueses com DFT.

Este estudo pretendeu contribuir sobretudo para a caracterização do espectro mutacional de doentes portugueses com DFT.

Foi realizada a pesquisa de mutações nos genes *MAPT*, *GRN* e *VCP*, de acordo com a indicação e pedido dos médicos, nas seguintes combinações: *MAPT* (n=9), *MAPT* + *GRN* (n=23), *GRN* (n=3), *GRN* + *VCP* (n=1), *MAPT* + *GRN* + *VCP* (n=31).

Foi feita PCR para amplificação de todos os exões e regiões intrónicas flanqueantes, seguida de sequenciação direta bidirecional, e de MLPA (para pesquisa de grandes rearranjos nos genes *MAPT* e *GRN*), em 67 doentes portugueses não aparentados: 37 homens e 30 mulheres, com manifestações clínicas sugestivas de DFT; 55 tinham diagnóstico clínico de DFT, 2 de DFT-ELA, 7 de DFT-parkinsonismo e 3 com um fenótipo de demência pouco definido.

A pesquisa de mutações por sequenciação identificou 69 variantes, incluindo 6 novas, descritas pela primeira vez neste estudo: c.1561+119 G>A, c.1561+165 G>A, c.1827+15 C>T no gene *MAPT*; e c.351G>T, c.811+2T>C, 2160+32A>G no gene *VCP*. Com base numa abordagem bioinformática, apenas a variante c.811+2T>C foi considerada como patogénica, fazendo com que este estudo seja o primeiro a identificar um doente português com uma mutação no gene *VCP*. A MLPA não mostrou deleções/duplicações em nenhum dos outros doentes.

Apesar das limitações do estudo, que se descrevem, foi possível excluir que as mutações nos genes *MAPT*, *GRN* e *VCP*, bem como os grandes rearranjos nos genes *MAPT* e *GRN*, sejam causa importante de DFT, nos doentes portugueses.

keywords

Frontotemporal dementia, FTD, frontotemporal lobar degeneration, FTLD, *MAPT*, *GRN*, *VCP* .

abstract

Frontotemporal dementia (FTD) is the second most common form of dementia in persons over age 65 years. FTD is an autosomal dominant disorder, caused by frontotemporal cerebral atrophy, covering a heterogeneous group of sporadic or familial neurodegenerative diseases. The most common presentation is an early change in personality and social behavior, with speech dysfunction. It may also associate with Parkinsonism, or with amyotrophic lateral sclerosis (ALS-FTD). Currently, five *loci* have been implicated in FTD. There are only 8 Portuguese patients with FTD described in the scientific literature.

This study aimed at contributing to the characterization of the mutational spectrum of FTD in Portuguese patients.

According to the physician's request, mutation analysis of *MAPT*, *GRN* and *VCP* genes was performed, in the following combination: *MAPT* (n=9), *MAPT* + *GRN* (n=23), *GRN* (n=3), *GRN* + *VCP* (n=1), *MAPT* + *GRN* + *VCP* (n=31). PCR of all exons and flanking intronic regions was followed by bidirectional direct sequencing, and by MLPA analysis (to detect large gene rearrangements) in *MAPT* and *GRN* genes, in 67 unrelated Portuguese patients: 37 males and 30 females, with clinical manifestations suggestive of FTD (55 with clinical diagnosis of FTD, 2 of FTD-ALS, 7 FTD-Parkinsonism, and 3 with an unclear dementia phenotype).

Mutation screening identified 69 sequence variations, including 6 novel variants (described for the first time in this study): c.1561+119 G>A, c.1561+165 G>A, c.1827+15 C>T in *MAPT*; and c.351G>T, c.811+2T>C, 2160+32A>G in *VCP*. Following a bioinformatics approach, c.811+2T>C was the only variant considered to be pathogenic, making this the first study to identify a *VCP* mutation in a Portuguese patient. MLPA did not show any deletions/duplications in any of the other patients.

Despite the limitations of this study, which we describe, it was possible to exclude that mutations in *MAPT*, *GRN* and *VCP*, as well as large rearrangements in *MAPT* and *GRN* are not a major cause of FTD in Portuguese patients.

Índice de conteúdos

Índice de conteúdos	1
Lista de figuras	3
Abreviaturas.....	4
Lista de tabelas.....	5
I. Introdução.....	6
1. Demência: conceito e enquadramento.....	6
2. Demência frontotemporal.....	6
2.1 Variante comportamental de DFT.....	7
2.2 Afasia não-fluente progressiva	8
2.3 Demência semântica	8
2.4 Degenerescência corticobasal	8
2.5 Demência frontotemporal com parkinsonismo.....	9
2.6 Esclerose lateral amiotrófica com demência frontotemporal (ELA–DFT)	9
3. Patologia.....	9
4. Genética molecular da demência frontotemporal.....	13
4.1 Gene <i>MAPT</i>	14
4.2 Gene <i>GRN</i>	16
4.3 Gene <i>VCP</i>	18
5. Tratamento.....	19
II. Objetivos	20
III. SUJEITOS E MÉTODOS.....	21
1. Sujeitos	21
2. Métodos	22
2.1 Extração de DNA	22
2.2 Quantificação do DNA	23
2.3 PCR (reação em cadeia da polimerase)	23
2.3.1 Desenho de <i>primers</i>	24
2.3.2 Condições de amplificação	27
2.4 Confirmação da reação de amplificação.....	27
2.5 Purificação de produtos de PCR	28
2.6 Reação de sequenciação.....	29
2.7 Análise bioinformática de variantes não descritas na bibliografia.....	30
2.8 <i>MLPA</i>	31
IV. Resultados.....	33
V. Discussão.....	38

1.	Estratégia de diagnóstico molecular da DFT	38
2.	Pesquisa de mutações nos genes <i>MAPT</i> , <i>GRN</i> e <i>VCP</i>	39
2.1	Gene <i>MAPT</i>	39
2.2	Gene <i>GRN</i>	40
2.3	Gene <i>VCP</i>	41
3.	A DFT em doentes portugueses.....	42
4.	Pesquisa de grandes rearranjos nos genes <i>MAPT</i> e <i>GRN</i>	44
5.	A baixa frequência de mutações encontradas em doentes portugueses com DFT e as limitações deste estudo.....	44
VI.	Conclusões	46
VII.	Perspectivas para o futuro	47
VIII.	Bibliografia	48
IX.	Anexos.....	53

Lista de figuras

Figura 1 – Corps de Pick.....	10
Figura 2 – Cérebro de doente com DFT, evidenciando a atrofia selectiva dos lobos frontal e temporal	10
Figura 3 – Histopatologia de DLFT–TAU: inclusões de tau anormal nos corpos de Pick e na astrogia ramificada.	11
Figura 4 – Esquema representativo do mecanismo molecular para a formação de tau anormal.....	12
Figura 5 – Histopatologia da DLFT–TDP: inclusões de TDP-43 nos neurónios.	12
Figura 6 – Histopatologia da DLFT–FUS: inclusões citoplasmáticas neuronais imunorreativas à FUS.....	13
Figura 7 – Localização das mutações descritas no gene <i>MAPT</i> e da composição das diferentes isoformas.	15
Figura 8 – Mecanismo patogénico proposto para as mutações <i>missense</i> e de <i>splicing</i> no exão e intrão 12.....	16
Figura 9 – Localização dos genes <i>MAPT</i> e <i>GRN</i> no cromossoma 17.	16
Figura 10 – Localização das mutações descritas no gene <i>GRN</i>	17
Figura 11 – Localização das mutações descritas no gene <i>VCP</i>	18
Figura 12 – Distribuição geográfica dos pedidos de teste genético para DFT, chegados ao CGPP, IBMC no período compreendido entre 2010-2012.	21
Figura 13 – Condições da reação de amplificação.....	27
Figura 14 – Imagem representativa de fragmentos amplificados do gene <i>MAPT</i> , obtida a partir do equipamento QIAxcel (QIAGEN, Hilden, Alemanha).....	28
Figura 15 – Esquema representativo da purificação de produtos de PCR, recorrendo ao uso de ExoSAP-IT.	29
Figura 16 – Condições da reação de sequenciação.	30
Figura 17 – Esquema representativo da reação <i>MLPA</i>	32
Figura 18 – Representação parcial de um eletroferograma do gene <i>VCP</i> , evidenciando a variante c.811+2T>C no doente DFT13 (A); e um controlo normal (B).	36
Figura 19 – Análise bioinformática da variante c.811+2T>C no gene <i>VCP</i> através do programa Alamut..	36
Figura 20 – Exemplo de uma <i>peak ratio</i> de uma reação de <i>MLPA</i> num “branco” (sem DNA).	37
Figura 21 – Exemplo de uma <i>peak ratio</i> de uma reação de <i>MLPA</i> numa mix de controlos de 3 DNA diferentes.....	37
Figura 22 – Exemplo de uma <i>peak ratio</i> de uma reação de <i>MLPA</i> numa amostra de DNA de um doente com diagnóstico clínico.....	37
Figura 23 – Esquema representativo da estratégia laboratorial utilizada para o diagnóstico molecular de demência frontotemporal (DFT) seguida neste estudo.	38

Abreviaturas

3R-tau - três repetições

4R-tau – quatro repetições

ANFP - afasia não-fluente progressiva

c9orf72 - *open reading frame* 72 do cromossoma 9

CADASIL - arteriopatia cerebral autossômica dominante com enfartes subcorticais e leucoencefalopatia

CGPP – Centro de Genética Preditiva e Preventiva

CHMP2B - *charged multivesicular body protein 2B*

DA - doença de Alzheimer

DCB - degenerescência corticobasal

DFT - demência frontotemporal

DLFT - degenerescência lobar frontotemporal

DLFT-FUS - degenerescência lobar frontotemporal associada à proteína FUS

DLFT-TAU - degenerescência lobar frontotemporal associada à proteína tau

DLFT-TDP - degenerescência lobar frontotemporal associada à proteína TDP

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTPs - desoxirribonucleotídeos trifosfatos

DS - demência semântica

ELA - esclerose lateral amiotrófica

ELA–DFT - esclerose lateral amiotrófica com demência frontotemporal

ER - retículo endoplasmático

ERAD - *endoplasmic reticulum associated degradation*

GRN - *granulin*

IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular

IBMPFD - miosite com corpos de inclusão, doença de Paget e demência frontotemporal

MAPT - *microtubule-associated protein tau*

MBD - *microtubule-binding domains*

miRNAs – micro RNA

MLPA - *multiplex ligation probe amplification*

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

PCR – reação em cadeia da polimerase

RNA – ácido ribonucleico

SIDA - síndrome da imunodeficiência adquirida

UPR - *unfolded protein response*

VCP - *vasolin-containing protein*

QMPSF - PCR multiplex quantitativo

Lista de tabelas

Tabela 1 – Características clínicas dos 67 doentes que constituem esta amostra.	21
Tabela 2 – Composição da solução de lise celular, TLE.....	22
Tabela 3 – Lista de primers desenhados para a amplificação de toda a região codificante do gene <i>GRN</i>	24
Tabela 4 – Lista de primers desenhados para amplificação de toda a região codificante do gene <i>MAPT</i>	25
Tabela 5 – Lista de primers desenhados para amplificação de toda a região codificante do gene <i>VCP</i>	26
Tabela 6 – Lista de variantes encontradas neste estudo, no gene <i>MAPT</i> , e previamente descritas na literatura como polimorfismos.	33
Tabela 7 – Lista de variantes encontradas neste estudo, no gene <i>GRN</i> , e previamente descritas na literatura como polimorfismos.	34
Tabela 8 – Lista de variantes encontradas neste estudo, no gene <i>VCP</i> , e previamente descritas na literatura como polimorfismos.....	35
Tabela 9 – Lista de variantes não classificadas encontradas neste estudo e respetiva predição bioinformática.	35
Tabela 10 – Frequência dos genótipos CC, CT e TT da variante rs5848, numa coorte de doentes portugueses com diagnóstico clínico de DFT.	41

I. Introdução

1. Demência: conceito e enquadramento

A demência é definida como perda significativa de capacidades intelectuais, como a memória, de modo suficientemente grave para interferir com o trabalho e outras interações sociais.

Estima-se que, em todo o mundo, existam 24,3 milhões de pessoas com demência e surjam 4,6 milhões novos casos anualmente. Devido ao envelhecimento da população, espera-se que o número de pessoas afetadas com demência duplique dentro de 20 anos.

A demência pode ser uma doença, por si só, como pode estar presente como sintoma de várias doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson, a doença de Huntington, a doença de Creutzfeldt-Jakob, a degenerescência frontotemporal; de doenças vasculares, como o CADASIL (arteriopatía cerebral autossómica dominante com enfartes subcorticais e leucoencefalopatia); de doenças inflamatórias, como a esclerose múltipla; de doenças infecciosas, como a SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida); de doenças neoplásicas; e até de acidentes associados a traumatismo craniano ou de despostos sujeitos a traumas cefálicos repetidos, como no boxe.

A doença de Alzheimer (DA) é a demência mais comum, seguida pela demência vascular, a demência com corpos de Lewis e a demência frontotemporal. Em Portugal, não é ainda conhecida a prevalência destes tipos de demência. São consideradas raras, mas poderão estar subdiagnosticadas (Guimarães *et al.*, 2006).

2. Demência frontotemporal

A demência frontotemporal (DFT) (OMIM# 600274, ORPHA282) é considerada como sendo uma demência pré-senil, pois afeta tipicamente doentes com idades compreendidas entre os 35 e os 75 anos. É clinicamente caracterizada pela apresentação gradual de alterações de personalidade (variante comportamental de DFT) e do comportamento social e disfunção da linguagem (a característica mais comum), como a demência semântica e afasia não-fluente progressiva (ANFP).

Com a evolução da doença, todos estes sintomas estão presentes, assim como perda de memória, déficit de atenção e outras alterações cognitivas (Neumann 2004; Gallo *et al.*, 2010).

Tal como o nome indica, afeta geralmente as áreas frontais e temporais do cérebro, com sintomas clínicos refletindo o envolvimento específico dessas regiões cerebrais.

A frequência relativa da DFT tem sido difícil de determinar, mas representará provavelmente 5-15% de todas as demências e 17–20% no caso das demências pré-senis (incluindo a DA).

Não foi ainda possível determinar com exatidão a sua prevalência, mas estudos ingleses e holandeses estimam que esteja entre cerca de 9,4 e 15/100,000 (Rosso *et al.*, 2003; Ratnavalli *et al.*, 2002). A dificuldade em obter dados populacionais sobre esta patologia está relacionada, em parte, com a sua baixa prevalência, mas sobretudo com a sua heterogeneidade clínica, neuropatológica e genética e com os diferentes critérios de diagnóstico aplicados, mesmo existirem já publicados critérios clínicos de consenso (Morris *et al.*, 2001).

A apresentação clínica pode ser heterogênea. Por esta razão, é frequentemente confundida com a doença de Alzheimer ou com uma patologia primariamente psiquiátrica.

Atualmente, foram já descritas 5 entidades clínicas incluídas na DFT: variante comportamental de DFT, afasia não-fluente progressiva, demência semântica, DFT com Parkinsonismo e esclerose lateral amiotrófica com demência frontotemporal. É este grupo de entidades diversas que se designa por degenerescência frontotemporal (DLFT) (Scarpini *et al.*, 2006).

2.1 Variante comportamental de DFT

A variante comportamental de DFT caracteriza-se por alterações de personalidade e de comportamento, e muitas vezes apatia e desinibição. A apatia conduz, devido à perda de interesse em assuntos pessoais e responsabilidades, ao isolamento social e, à medida que a doença avança, à negligência dos cuidados de higiene pessoal. A desinibição é manifestada pela uma multiplicidade de comportamentos socialmente inadequados, que pode levar ao desencadear de conflitos. Anatomicamente, caracteriza-se por atrofia do lobo frontal (Rabinovici e Miller, 2010).

2.2 Afasia não-fluente progressiva

A ANFP é uma doença progressiva de expressão da linguagem e do discurso motor associada à atrofia da região peri-sylviana esquerda. Os doentes apresentam discurso lento e esforçado, de produção e compreensão de gramática (agramatismo) comprometida, e déficit do discurso motor. É também caracterizada por apraxia da fala (dificuldade de iniciar o discurso), discurso lento, sequência incorreta ou omissão de fonemas; a disartria (dificuldade de articulação das palavras) é variável. A escrita e a leitura também são afetadas. Anatomicamente, a ANFP está associada a atrofia, hipometabolismo e hipoperfusão do opérculo frontal esquerdo, das áreas pré-motoras e motoras suplementares, e da ínsula anterior (Rabinovici e Miller, 2010).

2.3 Demência semântica

A demência semântica (DS) é caracterizada por afasia (deterioração da função da linguagem) fluente e anômica (i.e., com dificuldade em nomear, de forma correta, objetos, pessoas, locais ou acontecimentos) e mudanças de comportamento no ambiente de degeneração marcada, muitas vezes assimétrica dos lobos temporais anteriores (Rabinovici e Miller, 2010).

2.4 Degenerescência corticobasal

A degenerescência corticobasal (DCB) é uma doença rara, mas a sua incidência está potencialmente subestimada. As manifestações clínicas da DCB incluem alterações do movimento (acinesia, rigidez, distonia dos membros, *mioclonia reflexa focal*, tremor de ação/postura, instabilidade postural) e características corticais cerebrais (perda sensorial cortical, apraxia, demência, disfasia). As características neuropatológicas são uma atrofia cortical e da *substantia nigra*. Microscopicamente, existem numerosos neurónios corticais inchados, bem como placas astrocíticas imunorreativas, que não são observadas noutras tauopatias (conjunto de doenças que se caracterizam pela presença de proteína tau anómala). Nos estudos neuropatológicos, a DCB está associada a vários síndromes clínicos, como afasia progressiva primária, demência do lobo frontal, demência-apraxia-parkinsonismo, apraxia da fala e síndrome de Balint (Ludolph *et al.*, 2009).

2.5 Demência frontotemporal com parkinsonismo

A demência frontotemporal com parkinsonismo é uma demência do tipo do lobo frontal (alterações de personalidade e demência progressiva), associada a sintomas extrapiramidais (quadro parkinsoniano). A idade de início pode variar entre a 3ª e a 5ª décadas de vida. A duração da doença é de 8-10 anos, em média (Ludolph *et al.*, 2009; Rosso e Swieten, 2002).

2.6 Esclerose lateral amiotrófica com demência frontotemporal (ELA-DFT)

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva de apresentação na idade adulta, que afeta neurónios motores superiores e inferiores. A morte ocorre na maioria das vezes por insuficiência respiratória, 3 a 5 anos após o seu início. A ELA é hereditária (padrão mendeliano de hereditariedade) apenas em 5% dos casos, enquanto os restantes 95% são esporádicos. Mais recentemente, foi reconhecida a entidade ELA-DFT, esclerose lateral amiotrófica com demência frontotemporal. Esta doença é caracterizada pela sobreposição clínica e patológica entre a ELA e a DFT. A principal característica é a presença de anomalias cognitivas ligeiras, indicativas do envolvimento do lobo frontal em doentes com ELA, que podem estar presente em 50% dos doentes. Também estão descritos problemas comportamentais e de linguagem (Koppers *et al.*, 2011).

3. Patologia

A DFT foi descrita pela primeira vez em 1982, pelo neuropsiquiatra Arnold Pick, num doente com 71 anos de idade que sofria de demência progressiva, distúrbios de memória e afasia, associada a atrofia dos lobos frontal e temporal e com presença de inclusões neuronais, mais tarde designadas por corpos de Pick (Figura 1) (Kowalska, 2009).

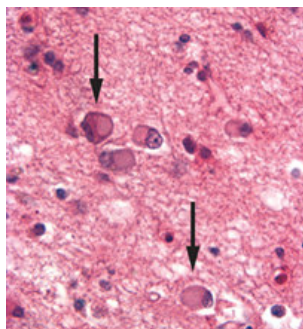


Figura 1 – Corpos de Pick (Murray, 2010).

Os achados anatomopatológicos mais comuns de DFT incluem atrofia circunscrita aos lobos frontal e temporal (Figura 2), com perda de neurónios e gliose, afetando a lâmina cortical superficial das regiões referidas, mas sem os achados anatomopatológicos típicos da doença de Alzheimer, as placas senis (agregados extracelulares de proteína beta-amilóide) e os entrançados neurofibrilares (formações intraneuronais de proteína tau), em quantidade significativa, ao nível da região límbica e do córtex parietotemporal. É possível também encontrar-se degenerescência de neurónios motores ou dos tratos corticoespinais (Goedert e Jakes, 2005; Tolnay *et al.*, 2000).



Figura 2 – Cérebro de doente com DFT, evidenciando a atrofia selectiva dos lobos frontal e temporal (Neumann *et al.*, 2009).

À atrofia seletiva dos lobos frontal e temporal dá-se o nome de degenerescência lobar frontotemporal. É consequência de presença de inclusões celulares formadas por agregados proteicos. Com base na histopatologia e de acordo com as proteínas associadas aos corpos de inclusão, é possível classificar a DLFT em 4 subtipos neuropatológicos: DLFT-TAU (também

conhecido como subtipo tau-positivo), DLFT-TDP, DLFT-FUS e DLFT sem histopatologia distinta (também conhecidos como subtipos tau-negativos) (Rohrer *et al.*, 2011).

Na DLFT-TAU, são identificadas inclusões de proteína tau anormal (Figura 3). Esta é uma proteína de ligação aos microtúbulos, que desempenha um importante papel na sua polimerização, montagem e estabilização da rede entre eles. É expressa nos neurónios. É encontrada normalmente nos axónios (podendo estar associada à membrana celular), mas também nas células da glia.

O grupo de doenças neurodegenerativas com tau anómala designa-se por “tauopatias”. Nestas situações, a tau está redistribuída pelo corpo celular e pelas dendrites. Molecularmente, este grupo de doenças é causado pelo metabolismo anormal da proteína tau, que tem um papel determinante no metabolismo do neurónio: transdução de sinal, plasticidade e transporte intracelular. Em caso de doença, esta proteína solúvel separa-se dos microtúbulos e forma tau anormal, agregada em estruturas fibrilares, hiperfosforilada e ubiquitinada (Figura 4). A composição molecular destes agregados está relacionada com a variabilidade fenotípica dentro deste grupo de doenças (Kowalska *et al.*, 2009; Ludolph *et al.*, 2009).

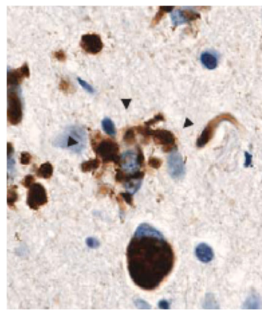


Figura 3 – Histopatologia de DLFT–TAU: inclusões de tau anormal nos corpos de Pick e na astroglia ramificada (setas) (Rabinovici e Miller, 2010).

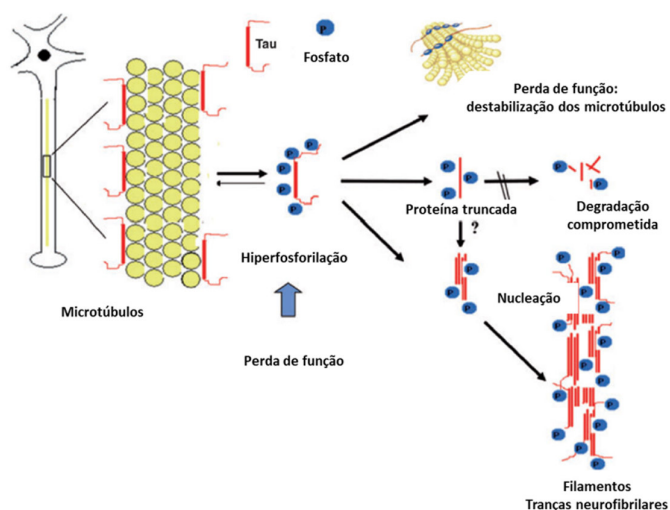


Figura 4 – Esquema representativo do mecanismo molecular para a formação de tau anormal (adaptado de Ludolph *et al.*, 2009).

O subtipo DLFT–TDP é caracterizado pela presença de inclusões citoplasmáticas neuronais imunorreativas a TDP43 (Figura 5), neurites distróficas, e em alguns casos inclusões intranucleares neuronais no neocortex frontotemporal e células granulares dentadas do hipocampo. A TDP43 é uma proteína nuclear altamente conservada, ubiquamente expressa, que regula o RNA de várias formas. Pensa-se que também esteja envolvida na neurodegenerescência, por várias vias, incluindo por ganho de função tóxica e perda de funções normais (Mackenzie e Rademakers, 2007; Neumann *et al.*, 2009).

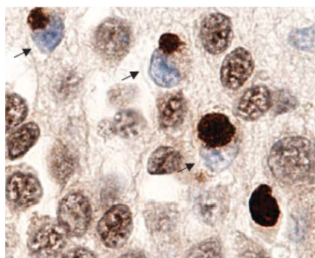


Figura 5 - Histopatologia da DLFT–TDP: inclusões de TDP-43 nos neurónios (Rabinovici e Miller 2010).

O subtipo DLFT-FUS é caracterizado por inclusões citoplasmáticas neuronais e inclusões intranucleares neuronais fortemente imuno-reativas à proteína FUS (Figura 6), e atrofia grave da cabeça do núcleo caudado, detectada por imagiologia. À semelhança da TDP43, a FUS é também ubiquamente expressa e é uma proteína de ligação DNA/RNA, envolvida em múltiplos aspetos da expressão, transcrição e tradução génica, e *splicing*, transporte e tradução do RNA. No entanto, a sua função precisa é ainda pouco conhecida. Os mecanismos subjacentes à patofisiologia que conduz à sua acumulação e à neurodegenerescência também ainda não são totalmente compreendidos (Neumann *et al.*, 2009).

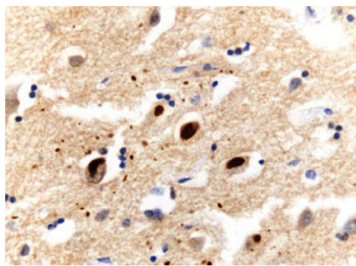


Figura 6 - Histopatologia da DLFT-FUS: inclusões citoplasmáticas neuronais imuno-reativas à FUS (Snowden, 2011).

Por fim, existe ainda um subtipo neuropatológico, designado por DLFT sem histopatologia distinta, que engloba as DFT que apresentam perda neuronal, gliose e microvacuolização, mas sem inclusões proteicas (Munoz *et al.*, 2003).

4. Genética molecular da demência frontotemporal

A demência frontotemporal é uma patologia complexa, que se pode apresentar de forma esporádica ou familiar. Cerca de 30-50% dos indivíduos com diagnóstico clínico de DFT têm história familiar de demência, com um padrão de hereditariedade autossómica dominante.

Até ao momento, já estão implicados 5 *loci* na DFT: os mais frequentemente mutados são os *MAPT* (*microtubule-associated protein tau*) e *GRN* (*granulin*), o *VCP* (*vasolin-containing protein*) (18 mutações descritas) e o *CHMP2B* (*charged multivesicular body protein 2B*) (4 mutações descritas); mais recentemente, foi descrita a expansão de uma repetição hexanucleotídica na

região não-codificante da *open reading frame* 72 (*c9orf72*), no cromossoma 9 (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011).

4.1 Gene *MAPT*

O gene *MAPT* (OMIM# 157140, ORPHA123144) é constituído por 15 exões, possui cerca de 134 kb, situa-se no 17q21.1 (Figura 9) e codifica a proteína tau associada aos microtúbulos, uma proteína citosólica importante para a neurogénese e a manutenção e transporte axonal (Hernandez e Avila 2007).

A sua ligação aos microtúbulos dá-se através de domínios específicos de ligação a microtúbulos (*MBDs*), localizados no terminal-C da proteína. O domínio de projeção para a superfície dos microtúbulos está localizado no seu terminal-N (Goedert, 2005).

Existem seis isoformas da proteína tau, derivadas do *splicing* alternativo do *mRNA* dos exões 3, 4 e 12 do gene *MAPT* (Figura 7). As isoformas podem variar de 352 a 441 aminoácidos. Diferem umas das outras pela presença ou ausência de uma inserção de 29 ou 58 aminoácidos no terminal-N e pela inclusão ou não de uma repetição de 31 aminoácidos, codificada pelo exão 12 no terminal-C. A exclusão do exão 12 leva à produção de três isoformas, cada uma delas contendo três repetições (3R-tau), enquanto a sua inclusão leva às outras três isoformas, cada uma com quatro repetições (4R-tau). Estas repetições constituem a região de ligação aos microtúbulos da proteína tau (Goedert, 2005; Brandt *et al.*, 2005).

As 3R-tau contêm três domínios de ligação de microtúbulos, consistindo cada um numa repetição imperfeita de 18 aminoácidos (MBD1, MBD3 e MBD4). As 4R-tau têm um domínio de ligação adicional (MBD2) codificada pelo exão 12. Os exões 3 e 4 codificam duas inserções no terminal-N, que não estão envolvidas na ligação da tau aos microtúbulos (Deerlin *et al.*, 2003; Rovelet-Lecrux *et al.*, 2009).

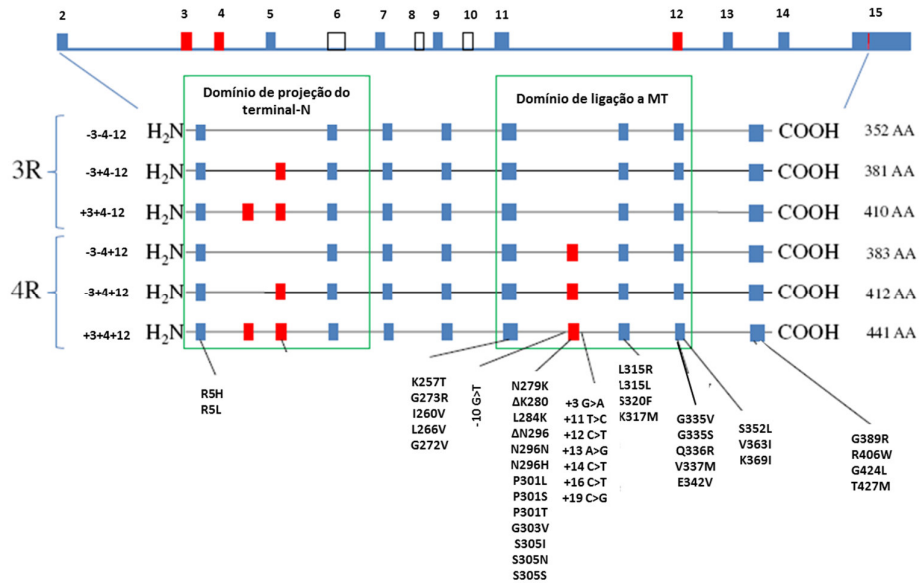


Figura 7 – Localização das mutações descritas no gene *MAPT* e da composição das diferentes isoformas (adaptado de Ferrari *et al.*, 2011).

As isoformas 3R-tau e 4R-tau são expressas a um nível semelhante no cérebro adulto. No cérebro humano em desenvolvimento, apenas a isoforma mais curta é expressa (três repetições, sem inserções no terminal-N), a qual se liga de forma três vezes mais fraca que a 4R-tau aos microtúbulos. As consequências funcionais das mutações no gene *MAPT* alteram o rácio entre as diferentes isoformas, podendo dar origem a uma capacidade diminuída da ligação da tau aos microtúbulos ou a um aumento na sua capacidade de agregação.

Até ao momento, foram descritas 44 mutações patogénicas (www.molgen.ua.ac.be/ad-mutations) (Figura 7) neste gene: *missense*, grandes deleções e deleções pontuais na região codificante; ou deleções intrónicas, localizadas perto de locais dadores de *splicing* do intrão 12, após o *splicing* alternativo do exão 12, e que alteram a razão 3R-tau/4R-tau (Figura 8) (Goedert, 2005).

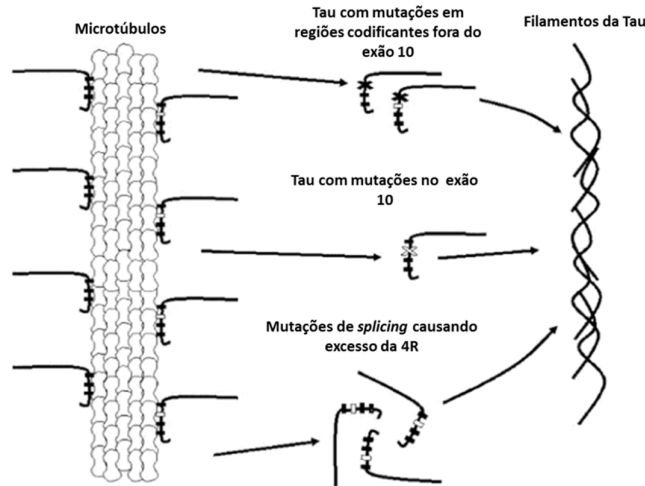


Figura 8 - Mecanismo patogénico proposto para as mutações *missense* e de *splicing* no exão e intrão 12 (adaptado de Hutton, 2000).

4.2 Gene *GRN*

O gene *GRN* (também conhecido como *PGRN*) (OMIM# 138045, ORPHA168073) situa-se em 17q21, a 1.7 Mb do gene *MAPT*, no sentido do centrómero (Figura 9).

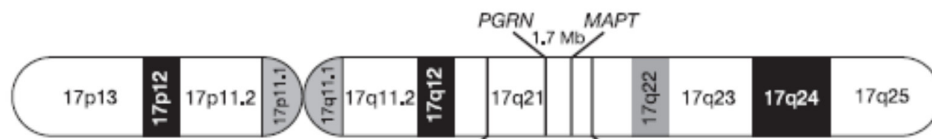


Figura 9 - Localização dos genes *MAPT* e *GRN* no cromossoma 17 (adaptado de Baker *et al.*, 2006).

O *GRN* codifica a proteína progranulina. Trata-se de uma glicoproteína de 88.5kDa, com 593 aminoácidos, que é um precursor da granulina. Esta proteína possui 7,5 domínios com repetições em *tandem*, altamente conservadas, de um motivo de 12 cisteínas, designado por “domínios do tipo granulina”. Os peptídeos da granulina são formados quando a progranulina sofre clivagem proteolítica, apesar do precursor por si só já ser biologicamente ativo. Esta proteína é um fator de

crescimento, altamente expresso, que está envolvido no desenvolvimento, cicatrização de feridas e inflamação. No sistema nervoso central, a progranulina é altamente expressa nos neurónios do córtex cerebral e mais intensamente no corno de Ammon e nas células Purkinje do cerebelo. É ainda expressa num conjunto de neurónios piramidais e também na microglia ativada. A progranulina foi ainda detetada em linhas celulares cultivadas de células hematopoiéticas e epiteliais, e é altamente expressa no tecido linfóide, na mucosa gastrointestinal, no baço e no epitélio da pele de roedores. Está também envolvida na tumorigénese e na diferenciação celular (Van Damme *et al.*, 2008).

O *GRN* contém 13 exões que codificam um transcrito completo e outros mais curtos, devido ao *splicing* alternativo. Até ao momento, foram identificadas 69 mutações (molgen.ua.ac.be/AD mutations) (Figura 10). As mutações patogénicas podem ser *nonsense* ou *missense*, pequenas inserções ou deleções. Muitas das mutações intrónicas nos locais de *splicing* dadores ou perto deles, resultam no *splicing-out* de exões distintos. A maioria das mutações leva a uma *frameshift* da sequência e a codões *stop* prematuros. Isto resulta em transcritos de mRNA mutado, que originam perda de função da progranulina e, consequentemente, haplo-insuficiência (quando a dosagem reduzida do gene normal não é suficiente para produzir um fenótipo normal), em vez de acumulação de proteína mutada (Swieten e Heutink, 2008; Ber *et al.*, 2007).

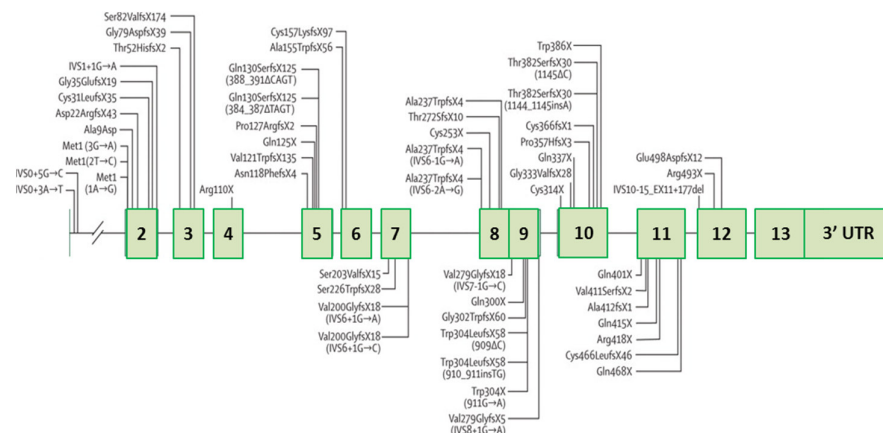


Figura 10 – Localização das mutações descritas no gene *GRN* (adaptado de Swieten e Heutink, 2008).

4.3 Gene VCP

O gene *VCP* (OMIM# 601023, ORPHA120461) situa-se no cromossoma 9 (9p13-p12) e codifica a *vasolin-containing protein*. Trata-se de uma proteína de 806 aminoácidos, altamente conservada, pertencente à família das proteínas AAA-ATPase (envolvidas em diversas atividades celulares), expressa de modo ubíquo e multifuncional. A VCP atua como uma chaperona molecular em várias funções celulares: regulação do ciclo celular, biogénese de organelos, morte celular programada, resposta ao *stress*, ativação e regulação transcripcional, fusão homotípica de membranas, reconstrução do envelope nuclear, remontagem de organelos após mitose, vias de autofagia, degradação de proteínas citosólicas, degradação de proteínas dependentes da ubiquitina, e degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático (*ERAD*). A perda de atividade desta proteína leva à acumulação de proteínas ubiquitinadas e inviabiliza a ERAD. A VCP facilita também o tráfego de agregados proteicos para corpos de inclusão. A ausência da VCP disrompe a formação do agressoma e a degradação de proteínas expandidas com poliglutamina.

Até ao momento, estão descritas 18 mutações (Figura 11), que têm como *hot-spot* o domínio terminal-N, que por sua vez está envolvido na ligação à ubiquitina e a interações proteína-proteína. A maioria destes resíduos causa a entidade clínica miosite com corpos de inclusão, doença de Paget e demência frontotemporal (IBMPFD). Estes resíduos estão localizados tridimensionalmente com proximidade uns aos outros e provavelmente interagindo entre si, sugerindo que se ligam a várias proteínas adaptadoras diferentes, impossibilitando que a VCP reconheça substratos específicos para a degradação proteossômica (Shaw, 2010; Badadani *et al.*, 2010; Ju *et al.*, 2009).

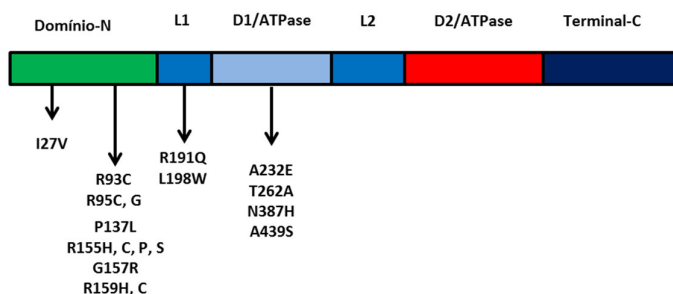


Figura 11 - Localização das mutações descritas no gene *VCP* (adaptado de Wehl, 2011).

5. Tratamento

Até ao momento não existe qualquer tratamento específico para a DFT. A terapêutica farmacológica usada nestes doentes é primariamente sintomática e semelhante à que se usa noutras patologias psiquiátricas ou noutras doenças neurodegenerativas com sintomas semelhantes. É baseada no tratamento com fármacos inibidores da recaptção da serotonina, para as alterações comportamentais. Nos doentes com perturbações da linguagem, pode ser aplicada terapia da fala (Rabinovici e Miller, 2010).

II. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Implementação do diagnóstico molecular de demência frontotemporal, no Centro de Genética Preditiva e Preventiva (CGPP), do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), através de técnicas de genética molecular (PCR, análise de mutações por sequenciação e *MLPA*);
2. Contribuir para a compreensão da base genética da demência frontotemporal e do seu grau de heterogeneidade genético e espectro mutacional em doentes portugueses;
3. Determinação da possível existência de '*hot-spots*' das mutações patogénicas nos principais genes implicados;
4. Em caso de descoberta de alterações nucleotídicas não descritas, avaliar a sua patogenicidade, recorrendo ao estudo familiar e a ferramentas de bioinformática;
5. Estabelecimento de correlação genótipo-fenótipo nas mutações encontradas.

III. SUJEITOS E MÉTODOS

1. Sujeitos

Foram investigados 67 doentes com diagnóstico clínico de DFT, provenientes de serviços hospitalares de neurologia de todo o país (Figura 12), chegados ao CGPP, IBMC no período compreendido entre 2010 e 2012.

As amostras foram previamente anonimizadas. Foram investigados 37 sujeitos do sexo feminino e 30 do sexo masculino; 23 casos tinham história familiar confirmada, 19 eram isolados e em 25 casos não foi possível determinar os antecedentes.

Quanto ao fenótipo, 55 casos tinham diagnóstico clínico de DFT, 2 de ELA-DFT, 7 de DFT-parkinsonismo e 3 com um fenótipo de demência pouco definido (Tabela 1).

Tabela 1 – Características clínicas dos 67 doentes que constituem esta amostra

Género		História Familiar			Diagnóstico clínico			
F	M	Sim	Não	Desconhecida	DFT	ELA-DFT	DFT-parkinsonismo	outros
37	30	23	19	25	55	2	7	3



Figura 12 – Distribuição geográfica dos pedidos de teste genético para DFT, chegados ao CGPP, IBMC no período compreendido entre 2010-2012.

2. Métodos

O estudo molecular dos doentes que constituem esta amostra decorreu em duas fases. A primeira compreendeu a sequenciação dos genes *MAPT*, *GRN* e *VCP*, de acordo com o pedido formulado pelo médico. A segunda fase envolveu a pesquisa de grandes rearranjos nos genes *MAPT* e *GRN* por *MLPA* (*multiplex ligation probe amplification*).

2.1 Extração de DNA

O primeiro passo para qualquer estudo em genética molecular passa pelo isolamento e purificação do ácido nucleico que é pretendido estudar, neste caso o DNA. Estas técnicas iniciam-se com o processo de libertação dos ácidos nucleicos, o que envolve a lise das células a estudar, seguida de digestão enzimática para destruir os componentes proteicos da mistura, seguida de um processo de purificação.

O DNA dos doentes foi extraído pelos técnicos responsáveis por este procedimento no CGPP, IBMC, através de metodologia semiautomática: (a) uma primeira fase, manual, em que é usada uma solução para lise dos glóbulos brancos, TLE (Tabela 2), seguida de centrifugação para o isolamento dos ácidos nucleicos; seguido de (b) uma fase automática onde é usado o *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), no aparelho *QIAcub* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 2 – Composição da solução de lise celular, TLE

Reagente	Volume (mL)
NH ₄ Cl 1M	310
KHCO ₃ 1M	20
EDTA 0,5M pH7.4	8
dH ₂ O	1662
Volume total	2000

2.2 Quantificação do DNA

A quantificação de DNA é feita por espectrofotometria, sendo efetuada a medição de absorvância a um comprimento de onda de 260 nm. Para estimar a pureza das amostras de DNA, determina-se a razão entre as absorvâncias medidas a 260nm e a 280nm. Para preparações de DNA puro, esta razão deve ser de 1,8. Os casos com valor superior a 1,8 correspondem a contaminação por RNA, enquanto que um valor inferior corresponde a contaminação com fenol ou proteínas.

As amostras de DNA foram quantificadas (pelos técnicos responsáveis por este procedimento no CGPP, IBMC), recorrendo-se para isso ao aparelho NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de DNA foram depois diluídas para 10 ng/μL, para sequenciação, e de 50 ng/μL, para *MLPA*. As alíquotas foram armazenadas a -20°C.

2.3 PCR (reação em cadeia da polimerase)

A análise direta do DNA foi efetuada por amplificação das regiões a estudar, através da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR). Esta técnica tem como principal objetivo a criação de múltiplas cópias da região de interesse do DNA, para amplificar a sua quantidade, permitindo assim realizar ensaios que de outro modo seriam impossíveis com a quantidade extraída habitualmente.

A metodologia envolve ciclos específicos de temperaturas e requer: (1) *primers*, que são pequenas sequências complementares à região de interesse do DNA que se pretende estudar, e que actuam como iniciadores da replicação *in vitro*; (2) DNA polimerase, enzima termoestável que irá proceder à replicação da cadeia de DNA; e (3) desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs), usados pela DNA polimerase para formar a cadeia replicada.

2.3.1 Desenho de *primers*

Os *primers* foram desenhados com o auxílio da ferramenta bioinformática online *Primer3plus* (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) para as regiões codificantes e sequências consenso flanqueantes dos genes alvo deste estudo: *MAPT* (NM_001123066.v3), *GRN* (NM_002087.v2) e *VCP* (NM_007126.v3) (Tabelas 3-5).

O *allele dropout*, incapacidade de emparelhamento do *primer* com a sequência de DNA, devido a alteração nucleotídica na cadeia *template*, foi excluído através da ferramenta bioinformática *snpcheck* (ngri.manchester.ac.uk/SNPCheckV2/snpcheck.htm). A estes *primers* foi ainda adicionada uma cauda M13F (5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT – 3'), *forward*, e M13R (5' – CAG GAA ACA GCT ATG ACC – 3'), *reverse*, para facilitar a reação de sequenciação, já que permite a utilização de um *primer* universal para todos os fragmentos.

Tabela 3 – Lista de *primers* desenhados para a amplificação de toda a região codificante do gene *GRN*

Gene	Exão	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Tamanho do fragmento
<i>GRN</i>	2_3_4	F - TGTAACACGACGCCAGTgaggtgttgagaaggctcag R - CAGGAAACAGCTATGACCgtacagatgccacatgaatga	848bp
	5_6_7	F - TGTAACACGACGCCAGTgtcaccctcaaaccagta CAGGAAACAGCTATGACCgtagcatgaaccctgcatca	826bp
	8_9	F - TGTAACACGACGCCAGTgagccagcttggtgtgt R - CAGGAAACAGCTATGACCcagcctagggcagatgaaga	738bp
	10	F - TGTAACACGACGCCAGTggctgctgccttttacc R - CAGGAAACAGCTATGACCgtcagagctgggtatcacct	458bp
	11_12	F - TGTAACACGACGCCAGTgagggcgggctggagtag R - CAGGAAACAGCTATGACCctgcgcaaacacttggtga	811bp
	13	F - TGTAACACGACGCCAGTcagtgggggacaggaacat R - CAGGAAACAGCTATGACCacacacacaaacacctgt	777bp

Tabela 4 – Lista de *primers* desenhados para amplificação de toda a região codificante do gene *MAPT*

Gene	Exão	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Tamanho do fragmento
<i>MAPT</i>	2	F - TGTAACGACGCCAGTaatatggagcacgggatgag R - CAGGAAACAGCTATGACtggccactcaaatatga	463bp
	3	F - TGTAACGACGCCAGTgagggaggtgggttgggt R - CAGGAAACAGCTATGACcaaagcaccgaaggagtga	385bp
	4	F - TGTAACGACGCCAGTcctacttcagggtcgttt R - CAGGAAACAGCTATGACCagattccaggagccagaat	371bp
	5	F - TGTAACGACGCCAGTaatgcccgaagtacagaga R - CAGGAAACAGCTATGACCgccaacctttgataagaacca	299bp
	6.1	F - TGTAACGACGCCAGTaacaggaggccctcagga R - CAGGAAACAGCTATGACtctgagctgggatcctgt	585bp
	6.2	F - TGTAACGACGCCAGTcaaggaggagtgatgaag R - CAGGAAACAGCTATGACtaggaacgtcagaagcagca	600bp
	7	F - TGTAACGACGCCAGTcaggcctagcagattcaag R - CAGGAAACAGCTATGACCaaaagcctgccccaaaatac	373bp
	8	F - TGTAACGACGCCAGTcacgcctggagatcactgct R - CAGGAAACAGCTATGACCagctctctttccctttgc	492bp
	9	F - TGTAACGACGCCAGTgccacgttttgatcaaggt R - CAGGAAACAGCTATGACCggactgagaaggcaatgaaga	391bp
	10	F - TGTAACGACGCCAGTtacaggggactcacactttgtaac R - CAGGAAACAGCTATGACCctcctaagcctatgtctcatct	559bp
	11	F - TGTAACGACGCCAGTctgcctaaccagtggtga R - CAGGAAACAGCTATGACCagaggggactgggtgttat	299bp
	12	F - TGTAACGACGCCAGTcgcatgtcactcatcgaaag R - CAGGAAACAGCTATGACtggagcccaagaaggattt	386bp
	13	F - TGTAACGACGCCAGTtgggaaccactgtccaataag R - CAGGAAACAGCTATGACCcgcgaagttcacactcaac	398bp
	14	F - TGTAACGACGCCAGTcccaatctaattttgctgtgc R - CAGGAAACAGCTATGACCcactggatgctgctgagg	600bp
	15	F - TGTAACGACGCCAGTtaggtgggagaatcacctgag R - CAGGAAACAGCTATGACtgaagtcaggccaaag	590bp

Tabela 5 – Lista de *primers* desenhados para amplificação de toda a região codificante do gene *VCP*

Gene	Exão	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Tamanho do fragmento
<i>VCP</i>	1	F - TGTAACGACGGCCAGTctcttctcggtcagctctca R - CAGGAACAGCTATGACCcgttctaaggagccaatc	594bp
	2_3	F - TGTAACGACGGCCAGTgtctaggagcagcttcatctattc R - CAGGAACAGCTATGACCagacaaccctgaagcataagtct	736bp
	4	F - TGTAACGACGGCCAGTctgttctccttctcttctcg R - CAGGAACAGCTATGACCagctgaccccatctcttaaaaa	439bp
	5	F - TGTAACGACGGCCAGTgaggtagggaatataatgaag R - CAGGAACAGCTATGACCaaagtactgggattacaggtgtcag	382bp
	6	F - TGTAACGACGGCCAGTgcacactaggtagtgaatgattt R - CAGGAACAGCTATGACCgccttaggtaaactaaaggatacg	373bp
	7	F - TGTAACGACGGCCAGTgagtgtggcctaaagtaattgtct R - CAGGAACAGCTATGACCaggatgtgttcataagtgtcca	351bp
	8_9	F - TGTAACGACGGCCAGTatatgtgagaagtaggcagaggttac R - CAGGAACAGCTATGACCgcttcaaggagattaggtgactt	570bp
	10	F - TGTAACGACGGCCAGTtttttagtctggcattaggac R - CAGGAACAGCTATGACCagcaactgcctagagacactgta	284bp
	11_12	F - TGTAACGACGGCCAGTgtacttaaaacccagccataaag R - CAGGAACAGCTATGACCccaggttctctagaagaagactcc	700bp
	13	F - TGTAACGACGGCCAGTtcttctagagaacctggatctga R - CAGGAACAGCTATGACCctctcagacctcagaaagaaaatc	487bp
	14	F - TGTAACGACGGCCAGTtcttagtctggctgtctcaa R - CAGGAACAGCTATGACCaccctaaccctcagtggaatc	487bp
	15	F - TGTAACGACGGCCAGTcaaagaaggggcaaactgtag R - CAGGAACAGCTATGACCggattcacctcagattcttta	417bp
	16_17	F - TGTAACGACGGCCAGTgatgtgatttctgtcctacagtt R - CAGGAACAGCTATGACCctccgctaccaaatgaaaat	551bp

2.3.2 Condições de amplificação

Para cada região de interesse estudada (fragmento), foi preparado a seguinte mix de reação: 1,25 μL de água, 1,50 μL do *primer F* e 1,50 μL do *primer R* a 10 μM , 6,25 μL de Taq DNA polimerase e 2,00 μL de DNA a 10 ng/ μL , perfazendo um volume total de 12,50 μL . Para o exão 1 do gene *VCP*, o volume de água foi substituído por DMSO. As amostras foram colocadas no termociclador, de acordo com as condições ilustradas na Figura 13.

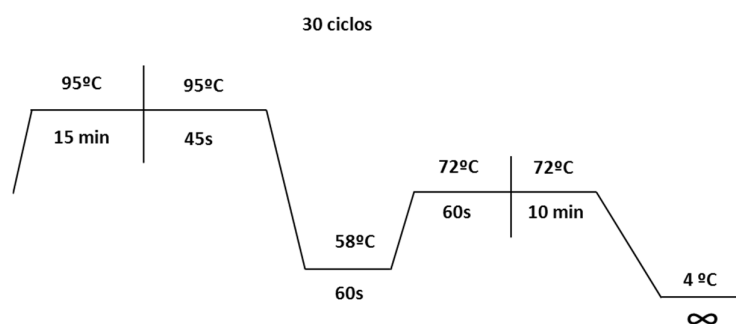


Figura 13 – Condições da reação de amplificação: no caso do exão 15 do gene *MAPT*, a temperatura de *annealing* foi de 60°C; nos exões 1, 16 e 17 do gene *VCP*, foram usados 35 ciclos, uma temperatura de *annealing* de 60°C e a extensão durou 90 seg.

2.4 Confirmação da reação de amplificação

A análise do produto de PCR amplificado é um passo muito importante na determinação da qualidade (presença ou ausência de bandas inespecíficas) e quantidade do DNA alvo que foi amplificado.

A confirmação de amplificação, bem como a exclusão de bandas inespecíficas e/ou de contaminação dos produtos de *PCR*, foi realizada no aparelho *QIAxcel* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante. Este equipamento permite rapidamente, de forma automática e sem recurso a manuseamento de substâncias tóxicas (por exemplo, o brometo de etídio, uma substância cancerígena), a confirmação da reação de amplificação, em

oposição à eletroforese convencional de DNA em gel de agarose, um método manual e demorado (Figura 14).

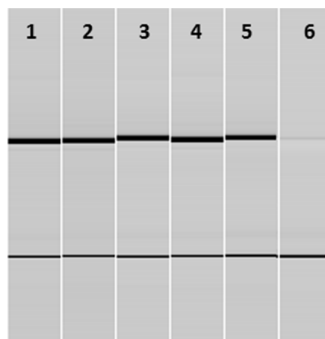


Figura 14 - Imagem representativa de fragmentos amplificados do gene *MAPT*, obtida a partir do equipamento *QIAxcel* (QIAGEN, Hilden, Alemanha): as bandas 1 a 5 representam a amplificação de fragmentos de DNA do grupo de doentes em estudo; a última banda (6) representa um controlo negativo (não amplificado), para efeitos de exclusão de possível contaminação.

2.5 Purificação de produtos de PCR

Quando a reação de amplificação termina, os dNTPs que não são incorporados, bem como os *primers* excedentes que ainda permanecem no produto de PCR, irão interferir com a sequenciação. Segue-se, por isso, a purificação de produtos de *PCR* para remoção desses contaminantes.

O exoSAP-IT é um *kit* comercial que utiliza duas enzimas hidrolíticas juntas, a *exonuclease I* e a *shrimp alkaline phosphatase*, para remover dNTPs e *primers* excedentários do produto de PCR. A *exonuclease I* remove os *primers* de cadeia única residuais e ainda qualquer cadeia única de DNA resultante da PCR. A *shrimp alkaline phosphatase* remove os restantes dNTPs da PCR, não ocorrendo qualquer perda de amostra se os produtos de PCR tiverem um tamanho compreendido entre os 100pb e os 20kb (Figura 15).

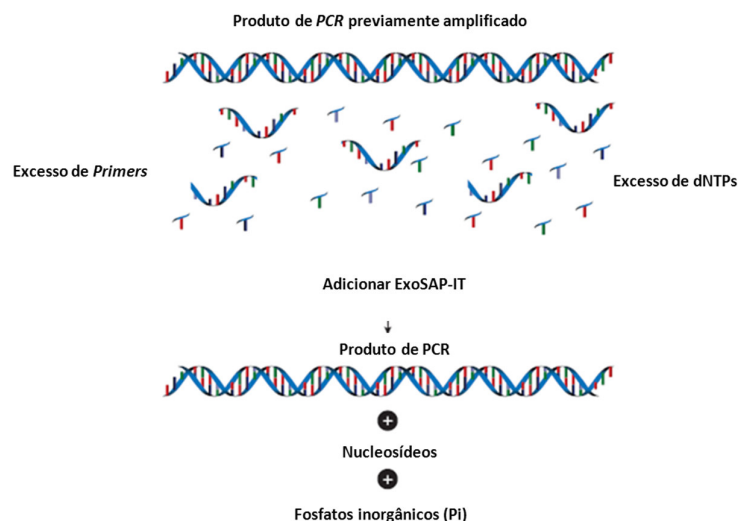


Figura 15 – Esquema representativo da purificação de produtos de PCR, recorrendo ao uso de ExoSAP-IT (adaptado de www.usbweb.com/assets/ExoSAP-IT_salestool_2009.pdf).

Para a purificação dos produtos amplificados, utilizou-se 1 μL de *ExoSap IT*, por cada 4 μL de amostra, que se colocou no termociclador durante 15 min, a 37°C (incubação da enzima), o que foi seguido de 15 min a 80°C (inativação da enzima). As amostras purificadas foram conservadas a -20°C.

2.6 Reação de sequenciação

A reação de sequenciação foi realizada de acordo com o método de Sanger *et al.* (1977), recorrendo a nucleótidos terminadores da cadeia, que são didesoxinucleótidos trifosfatados marcados com um fluorocromo na extremidade 3' (ddNTP). A 2,5 μL de produto de PCR purificado, adicionou-se 2 μL de *Big Dye*, 0,5 μL do *primer* M13F ou M13R e 5 μL de água. As condições de temperatura desta reação estão ilustradas na Figura 16.

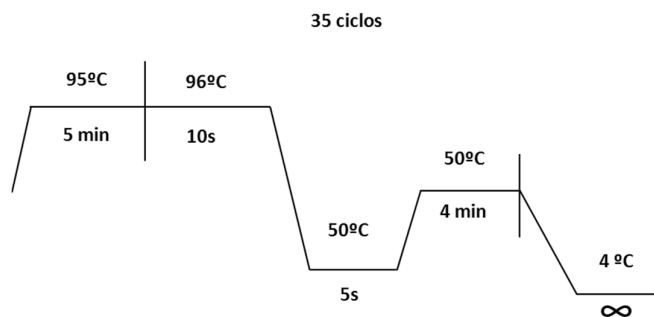


Figura 16 – Condições da reação de sequenciamento.

À semelhança da reação de amplificação, também a reação de sequenciamento requer um passo de purificação. A purificação foi feita em placas *DyeEx* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

A sequenciação automática foi realizada no aparelho *ABI 3130xl/ Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América). O sequenciador deteta a fluorescência dos 4 didesoxinucleótidos, distinguindo os diferentes comprimentos de onda de luz emitida por radiação da amostra. Os resultados foram analisados no programa *SeqScape®* v2.6 (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América).

2.7 Análise bioinformática de variantes não descritas na bibliografia

As variantes encontradas neste estudo e que não estavam registadas nas bases de dados “dbSNP” (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/) e “1,000 genomes” (www.1000genomes.org/) foram classificadas como variantes não descritas.

Foi seguida uma estratégia bioinformática para a previsão da sua patogenicidade, recorrendo às ferramentas *Alamut 2.1 (interactive-biosoftware)* que, entre outras funcionalidades, permite prever o efeito de uma determinada variante com base em 8 algoritmos diferentes (*PolyPhen-2*, *SIFT*, *Align GVGD*, *SpliceSiteFinder*, *MaxEntScan*, *NNSPLICE*, *GeneSplicer* e *Human Splicing Finder*), bem como através do *MutationTaster* (www.mutationtaster.org).

2.8 MLPA

A *MLPA* (*multiplex ligation probe amplification*) é uma técnica relativamente recente (Schouten *et al.*, 2002) que permite a identificação de grandes rearranjos (> 1Kb), deleções e duplicações, tanto de exões individualmente como de genes completos, através da comparação da quantificação de produtos gerados pelas sondas de *MLPA* para os genes *MAPT* e *GRN* das amostras dos indivíduos com DFT e as amostras controlo. O valor normal será, pois, de 1, com intervalo aceitável entre 0,75 e 1,25. Valores inferiores a 0,75 indicam assim uma deleção, enquanto valores superiores a 1,25 indicam uma duplicação.

A *MLPA* é baseada no princípio da *PCR multiplex*, com a exceção de que em vez de amplificar DNA, amplifica sondas (Figura 17). Esta técnica está organizada em 5 fases: a) desnaturação (DNA é primeiro desnaturado a 98°C); b) hibridização das múltiplas sondas de *MLPA* aos múltiplos alvos; c) ligação (as duas zonas de cada sonda hibridizam com as sequências alvos adjacentes e são ligadas por uma ligase termoestável); d) amplificação (todos os produtos de ligação das sondas são amplificados num *PCR multiplex* usando apenas um par de *primers*; e) separação dos produtos de amplificação por eletroforese (num sequenciador automático).

Nesta técnica, as sondas usadas foram as que constituem o *kit Probemix P275-C1 MAPT-GRN* e o procedimento prático seguido foi de acordo com as instruções do fabricante. A fase de separação dos produtos de amplificação por electroforese decorreu no equipamento *ABI 3130xl/ Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América) e os resultados foram analisados no *software GeneMarker V2.2.0 (SoftGenetics)*.

Todos os reagentes utilizados nesta metodologia são comercializados pela empresa MCR-Holland (Amsterdão, Holanda).

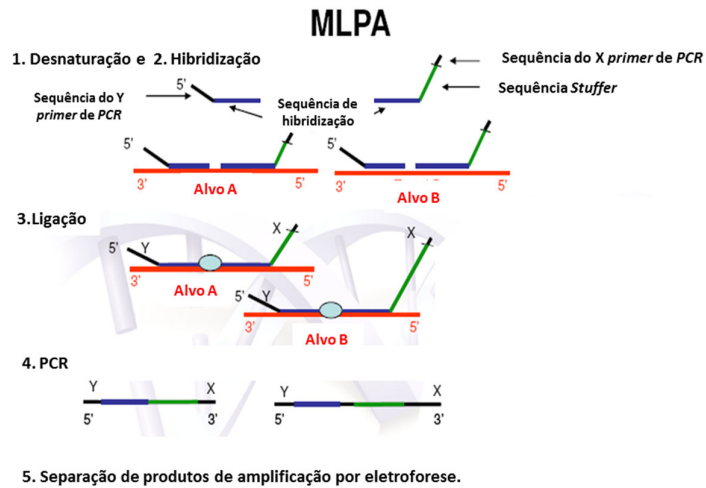


Figura 17 – Esquema representativo da reação *MLPA* (adaptado de <http://www.MLPA.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwrZhCATZhNORpCBrCEQLdKlKkAOBU5tP/FbWg>).

IV. Resultados

Após a análise dos genes alvo *MAPT*, *GRN* e *VCP*, em 67 doentes com diagnóstico clínico de demência frontotemporal, foram encontradas no total 69 variantes: 63 já previamente descritas na literatura como sendo polimorfismos (Tabelas 6-8) e 6 variantes novas, descritas pela primeira vez neste estudo (Tabela 9). Para estas últimas, foi seguida uma abordagem bioinformática para tentar prever a sua patogenicidade, recorrendo-se para isso a duas ferramentas bioinformáticas, o *Alamut* e o *MutationTaster* (Tabela 9). Apenas a variante c.811+2T>C, encontrada no gene *VCP* (Figura 18), foi considerada como sendo provavelmente patogénica (Figura 19).

Tabela 6 – Lista de variantes encontradas neste estudo, no gene *MAPT*, e previamente descritas na literatura como polimorfismos

Gene	Variante no DNA	Proteína	Exão/ Intrão	Referência dbSNP
<i>MAPT</i>	c.605 C>T	p.P202L	Ex6	rs63750417
	c.637 G>A	p.G213R	Ex6	rs76375268
	c.689 A>G	p.Q230R	Ex6	rs 63750072
	c.853 G>A	p.D285N	Ex6	rs62063786
	c.855 C>T	p.V285N	Ex6	rs63750222
	c.866 T>C	p.V289A	Ex6	rs62063787
	c.953 C>T	p.S318L	Ex6	rs73314997
	c.1108 C>T	p.R370W	Ex6	rs17651549
	c.1321 T>C	p.Y441H	Ex8	rs2258689
	c.1339 T>C	p.S447P	Ex8	rs10445337
	c.1479 G>A	-	Ex9	rs1052551
	c.1512 T>C	-	Ex10	rs62063845
	c.1686 A>G	-	Ex11	rs1052553
	c.1770 T>C	-	Ex11	rs17652121
	c.1815 G>A	-	Ex11	rs11568305
	c.-13 A>G	-	In1	rs17650901
	c.134-92 T>C	-	In2	rs62063303
	c.220+18 C>T	-	In3	rs75242405
	c.307+9 A>G	-	In4	rs1800547
	c.307+87 G>A	-	In4	rs17651213
	c.374-52 G>A	-	In5	rs80189278
	c.1126+21 C>T	-	In6	rs113608413
	c.1126+48_1126+56 delCCTCCCAGG	-	In6	rs138482356
	c.1127-72 T>C	-	In6	rs62063793
	c.1380+67 A>G	-	In8	rs79447161

	Variante no DNA	Proteína	Exão/ Intrão	Referência dbSNP
<i>MAPT</i>	c.1380+105 T>C	-	In8	rs17651754
	c.1508-201 C>G	-	In9	rs117861071
	c.1562-31 T>C	-	In10	rs112663614
	c.1562-26 G>A	-	In10	rs117200923
	c.1827+40 C>T	-	In11	rs150660024
	c.1827+103 G>A	-	In11	rs117562189
	c.1828-58 G>A	-	In11	rs147310649
	c.1920+29 G>A	-	In12	rs63751443
	c.1920+66 C>T	-	In12	rs190460717
	c.2002+90 G>A	-	In13	rs66499584
	c.2002+34 G>A	-	In13	rs75534191
	c.2002+104 A>G	-	In13	rs149026844

Tabela 7 – Lista de variantes encontradas neste estudo, no gene *GRN*, e previamente descritas na literatura como polimorfismos

Gene	Variante no DNA	Proteína	Exão/ Intrão	Referência dbSNP
<i>GRN</i>	c.264+7G>A	-	In3	rs60100877
	c.264+21G>A	-	In3	rs9897526
	c.350-50_350-47dup	-	In4	rs34424835
	c.350-47_350-46insGTCA	-	In4	rs34424835
	c.350-51_350-48dup	-	In4	rs113219200
	c.384 T>C	-	Ex5	rs25646
	c.462+24G>A	-	In5	rs850713
	c.835+7G>A	-	In8	rs72824736
	c.1515C>T	-	Ex12	rs147495221
	c.*78C>T	-	3'UTR	rs5848

Tabela 8 – Lista de variantes encontradas neste estudo, no gene *VCP*, e previamente descritas na literatura como polimorfismos

Gene	Variante no DNA	Proteína	Exão/ Intrão	Referência dbSNP
<i>VCP</i>	c.17+146G>A	-	In1	rs149858552
	c.129+47G>A	-	In2	rs10972300
	c.445+92_445+93insA	-	In4	rs35504855
	c.708+55 G>A	-	In6	rs150251323
	c.811+3G>A	-	In7	rs514492
	c.1082-23_1082-22ins11	-	In9	rs34169540
	c.1082-8_1082-7ins11	-	In9	rs11272867
	c.1360-35A>G	-	In11	rs2258240
	c.1360-14C>G	-	In11	rs144304208
	c.1482+52T>C	-	In12	rs562381
	c.1483-99 T>C	-	In12	rs186433370
	c.1696-330T>C	-	In13	rs72722960
	c.1696-223G>T	-	In13	rs72722958
	c.1704A>G	-	Ex14	rs142577424
	c.*153G>T	-	3'UTR	rs1053318

Tabela 9 – Lista de variantes não classificadas encontradas neste estudo e respetiva predição bioinformática

Gene	Variante no DNA	Proteína	Exão/Intrão	Doente	Predição bioinformática	
					<i>Alamut 2.1</i>	<i>MutationTaster</i>
<i>MAPT</i>	c.1561+119 G>A	-	In10	DFT55	benigna	benigna
	c.1561+165 G>A	-	In10	DFT29	benigna	benigna
	c.1827+15 C>T	-	In11	DFT34	benigna	benigna
<i>VCP</i>	c.351G>T	-	Ex4	DFT25	benigna	benigna
	c.811+2T>C	-	In7	DFT13	patogénica	patogénica
	2160+32A>G	-	In15	DFT13, DFT15	benigna	benigna

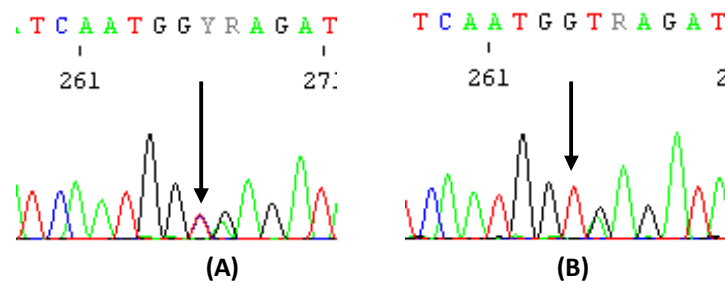


Figura 18 – Representação parcial de um eletroferograma do gene *VCP*, evidenciando a variante c.811+2T>C no doente DFT13 (A); e um controlo normal (B).



Figura 19 – Análise bioinformática da variante c.811+2T>C no gene *VCP* através do programa *Alamut*.

Relativamente à aplicação da técnica de MLPA, todos os doentes apresentaram dosagens das sondas dentro dos valores normais (0.75-1.25), pelo que não foram encontrados rearranjos dos genes *MAPT* e *GRN* em nenhum dos doentes estudados (Figuras 20-22).

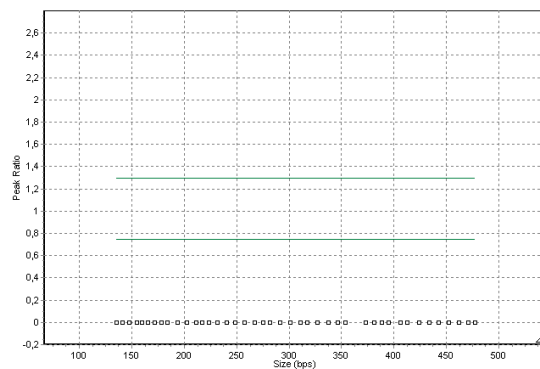


Figura 20 – Exemplo de uma *peak ratio* de uma reação de MLPA num “branco” (sem DNA).

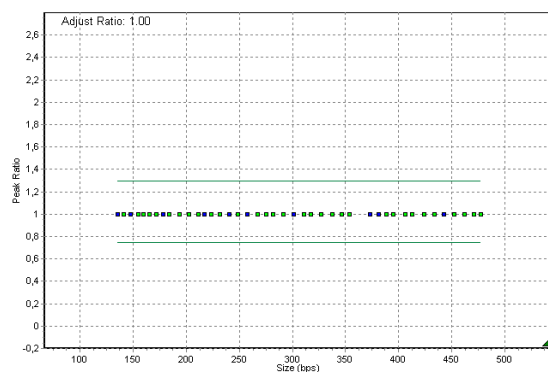


Figura 21 – Exemplo de uma *peak ratio* de uma reação de MLPA numa *mix* de controlos de 3 DNA diferentes; os pontos verdes representam sondas controlo e os pontos azuis representam as sondas complementares aos genes alvo *MAPT* e *GRN*.

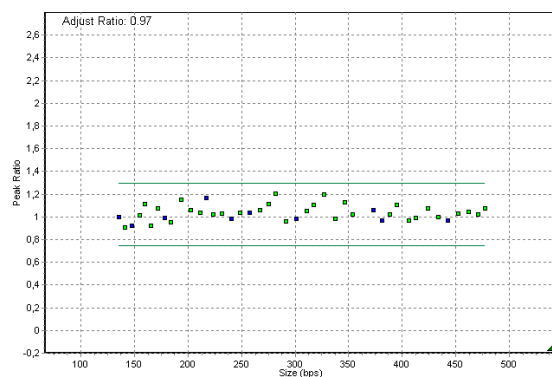


Figura 22 – Exemplo de uma *peak ratio* de uma reação de MLPA numa amostra de DNA de um doente com diagnóstico clínico; os pontos verdes representam sondas controlo e os pontos azuis representam as sondas complementares aos genes alvo *MAPT* e *GRN*; todos os pontos estão dentro dos valores normais (0,7 – 1,3).

V. Discussão

1. Estratégia de diagnóstico molecular da DFT

O objetivo inicial deste trabalho foi a implementação do diagnóstico molecular de demência frontotemporal no Centro de Genética Preditiva e Preventiva, do IBMC, um laboratório de testes genéticos para diversas doenças neurológicas e outras, onde surgiu a necessidade da oferta do diagnóstico desta doença.

Assim, foram instaladas as técnicas de genética molecular para sequenciação dos genes *MAPT*, *GRN* e *VCP*, assim como a MLPA para pesquisa de grandes rearranjos nos genes *MAPT* e *GRN*. Este trabalho permitiu fazer-se ali, até ao momento, o estudo molecular de 67 doentes com um diagnóstico clínico de DFT.

Os genes estudados foram-no de acordo com o pedido do médico requisitante, nas seguintes combinações de pedidos: *MAPT* (n=9), *MAPT+GRN* (n=23), *GRN* (n=3), *GRN+VCP* (n=1), *MAPT+GRN+VCP* (n=31).

O procedimento laboratorial decorreu em duas fases (Figura 23): (1) sequenciação das regiões codificantes e intrónicas flanqueantes dos genes *MAPT*, *GRN*, *VCP*; e (2) pesquisa de grandes rearranjos nos *MAPT* e *GRN*, por MLPA. Se após a sequenciação dos 3 genes alvo se encontrasse uma variante já descrita na literatura como sendo patogénica, e uma vez que se trata de uma doença com hereditariedade autossómica dominante, não seria necessário continuar a pesquisa; o teste era dado por concluído e o diagnóstico molecular confirmaria o diagnóstico clínico.

Se a sequenciação não identificasse mutações e a MLPA (que acabou por ser necessária em todos os casos) não identificasse rearranjos na sequência de DNA dos genes *MAPT* e *GRN*, o diagnóstico clínico permaneceria por se confirmar. Caso a MLPA identificasse rearranjos, seriam necessárias outras medidas, tais como estudos de segregação e pesquisa bibliográfica do fenótipo associado ao rearranjo encontrado, antes de uma decisão quanto à sua patogenicidade.

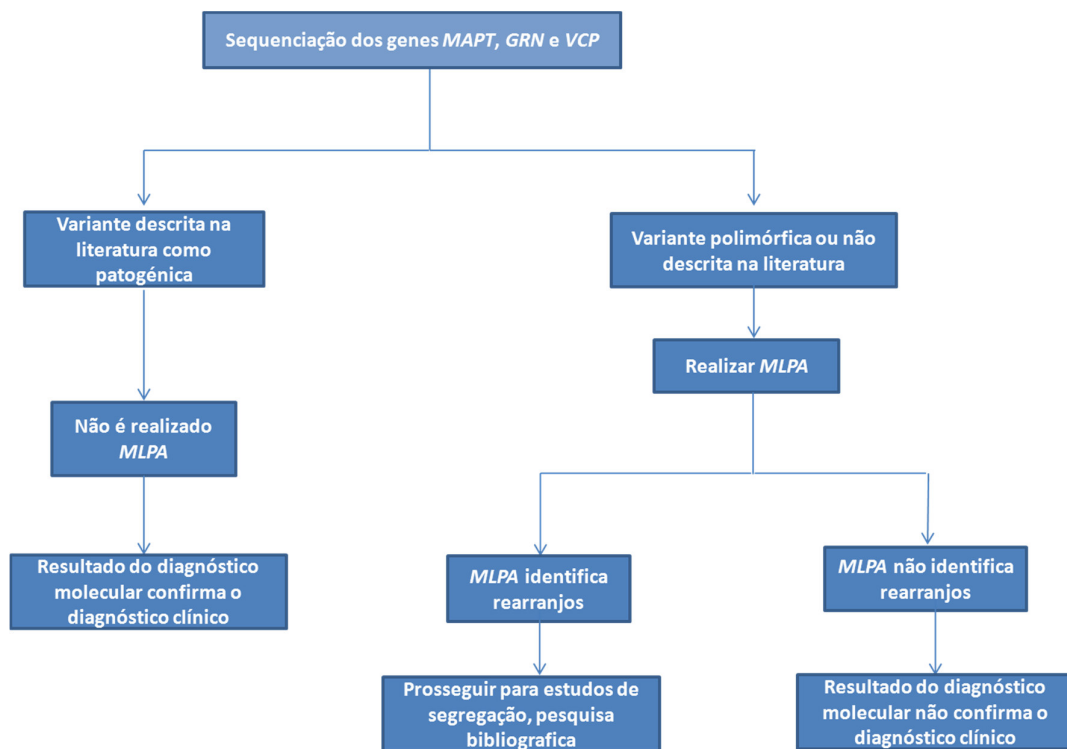


Figura 23 – Esquema representativo da estratégia laboratorial utilizada para o diagnóstico molecular de demência frontotemporal (DFT) seguida neste estudo.

2. Pesquisa de mutações nos genes *MAPT*, *GRN* e *VCP*

As variantes encontradas no estudo destes genes e que haviam já sido descritas na literatura foram apresentadas nas Tabelas 6 a 8. As seis variantes novas, ainda não descritas, encontradas neste estudo foram apresentadas na Tabela 9.

2.1 Gene *MAPT*

A pesquisa de mutações no gene *MAPT* foi realizada em 63 doentes (94%) e permitiu identificar 38 variantes previamente descritas na literatura como polimorfismos, bem como 3 variantes intrónicas ainda não descritas: c.1561+119 G>A, c.1561+165 G>A e c.1827+15 C>T.

De entre os polimorfismos encontrados, é de salientar a variante c.1920+29 G>A, localizada no intrão 12, a qual foi encontrada em 2 casos. Quando o *MAPT* era o único gene conhecido como sendo causador de DFT, a sua patogenicidade não estava ainda esclarecida. As primeiras descrições desta variante na literatura indicavam que fosse um polimorfismo raro (D'Souza *et al.*, 1999). Sabia-se já que o exão 12 e a sua região intrónica adjacente eram um *hotspot* de mutações neste gene. Mais tarde, Stanford *et al.* (2003), apoiados por estudos de segregação (a variante co-segregava com o fenótipo da doença em várias gerações de uma família) e funcionais, indicavam que pudesse ser patogénica por diminuição de *splicing* no exão 12, originando desequilíbrio do ratio 3R/4R, com predominância da isoforma 3R, mas sem precipitação da tau. Logo após a descoberta de que mutações no gene *GRN* causam DFT (Baker *et al.*, 2006; Cruts *et al.*, 2006), esta variante no gene *MAPT* foi encontrada num doente que também possuía a mutação Arg493X no *GRN* (Pickering-Brown *et al.*, 2006), aliás uma das mais frequentes neste gene. Esta descrição, aliada ao facto de, nos estudos mencionados, a variante surgir sempre apenas na população controlo, permitiu excluir a patogenicidade da alteração c.1920+29 G>A.

As variantes c.1561+119 G>A e c.1561+165 G>A, descritas pela primeira vez neste estudo e ambas localizadas no intrão 10, estão numa região já bastante distante das regiões críticas de *splicing*, enquanto que a variante c.1827+15 C>T, no intrão 11, está mais próxima destas e seria candidata a ser patogénica.

A sua análise bioinformática confirmou que não se localizavam em locais de consenso e não identificou a introdução de qualquer novo local de *splicing* que pudesse ser causador de desequilíbrio do rácio das isoformas 3-R/4-R. Assim sendo, estas variantes não parecem ser a causa de DFT nestes doentes. Prevê-se, pois, que sejam benignas, muito provavelmente, polimorfismos raros.

2.2 Gene *GRN*

O *GRN* foi estudado em 58 doentes (87%). Foram encontrados 10 polimorfismos já descritos na literatura, incluindo o rs5848 (c.*78C>T). Esta alteração está localizada 78 nucleótidos a jusante do codão de terminação da tradução na 3' UTR, que se prevê seja um local de ligação para um micro-RNA (*miRNA*) humano específico, o *miR-659*. Os *miRNAs* são pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão génica ao nível pós-transcricional.

Tabela 10 – Frequência dos genótipos CC, CT e TT da variante rs5848, numa coorte de doentes portugueses com diagnóstico clínico de DFT.

Variante	Nº de doentes	Genótipo CC (%)	Genótipo CT (%)	Genótipo TT (%)
rs5848	58	30 (51.7%)	23 (39.7%)	5 (8.6%)

Numa coorte de doentes norte americanos foi inicialmente descrito que esta variante em homozigotia seria um fator de risco para FTLD-TDP esporádica. Através de estudos bioquímicos e de imunohistoquímica, Rademakers *et al.* (2008) demonstraram que: (1) a presença do alelo T em homozigotia reduzia a expressão da proteína GRN, mimetizando o efeito das mutações em heterozigotia, com perda da função característica deste gene; (2) os achados neuropatológicos dos portadores do alelo T em homozigotia são semelhantes aos do subtipo neuropatológico FTLD-U de portadores de mutações no gene *GRN*; e (3) os homozigotos para o alelo T tinham um risco 3,2 vezes aumentado de desenvolver FTLD-U, quando comparados com os sujeitos CC.

No entanto, os estudos que se seguiram numa coorte alemã (Simon-Sanchez *et al.*, 2009) e numa europeia (Rollinson S *et al.*, 2011), na tentativa de replicar esta observação, não foram bem sucedidos.

Neste estudo, o polimorfismo rs5848 em homozigotia foi encontrado em 5 indivíduos afectados (Tabela 10). No entanto, à luz dos estudos já realizados, não é possível concluir acerca de este constituir um fator de risco para a doença nestes indivíduos.

2.3 Gene *VCP*

O gene *VCP* foi estudado em 32 doentes. Foram encontrados 14 polimorfismos já previamente descritos na literatura e 3 variantes novas: c.351G>T, 2160+32A>G e c.811+2T>C.

A variante c.351G>T, no exão 4, encontrada num doente, não origina troca de aminoácido (substituição sinónima). A variante 2160+32A>G, no intrão 15, foi encontrada em 2 doentes. A

análise bioinformática destas duas variantes não identificou a criação de qualquer local de *splicing*, pelo que se prevê que serão benignas e, muito provavelmente, polimorfismos raros.

A variante c.811+2T>C foi encontrada, no intrão 7, em apenas um doente. Os 6 algoritmos usados na sua análise bioinformática identificaram, em concordância, a perda do local dador de *splicing* em 5', alterando a sequência de consenso GU de iniciação do intrão. Não foi possível ter acesso a DNA de familiares para realizar estudos de segregação, nem foi possível prosseguir estudos de mRNA, no sentido de determinar qual o efeito que esta variante teria ao nível do RNA. No entanto, será de prever que, uma vez há perda do local dador de *splicing*, ocorra a incorporação do intrão 7 no pré-mRNA, o que muito provavelmente originará uma proteína truncada, devido aos vários codões STOP no intrão 7.

Esta alteração foi identificada numa mulher de 62 anos, sem história familiar de DFT, com alterações de comportamento (obsessivo e agressivo), mnésicas e extrapiramidais (*retrocoli*), e atrofias musculares.

Nesta mesma mulher foi também identificada a variante 2160+32A>G, mencionada anteriormente que, a confirmar-se a patogenicidade da alteração c.811+2T>C, será mais um facto a suportar que a primeira será um polimorfismo.

3. A DFT em doentes portugueses

Até ao momento, foram descritos 8 doentes portugueses com DFT na literatura: 2 irmãos com uma mutação frameshift (p.Gln300GlnfsX61) no gene *GRN* (Guerreiro *et al.*, 2008); e, mais recentemente, um doente com a mutação IVS9+1delG (Taipa *et al.*, 2012), também no gene *GRN*, e 5 doentes com a expansão hexanucleotídica na *C9orf72* (Chester *et al.*, 2012).

A c.811+2T>C, identificada neste trabalho, será a primeira descrição de um doente português com uma mutação no *VCP*. Mutações neste gene estão associadas a um espectro fenotípico heterogéneo (esclerose lateral amiotrófica, familiar ou esporádica; esclerose lateral amiotrófica com demência frontotemporal; miopatia com corpos de inclusão - doença de Paget - demência frontotemporal; e, mais recentemente, paraparésia espástica hereditária).

Os sinais clínicos atípicos desta doente contribuem ainda mais para essa diversidade. Em todo o caso é importante continuar a seguir a doente no sentido de estar alerta para outros sintomas que se possam vir a desenvolver e que possam ajudar a esclarecer melhor o seu diagnóstico.

A variabilidade fenotípica que se tem vindo a constatar estar associada às mutações no gene *VCP* pode ser explicada pela classe de proteínas a que a *VCP* pertence e, consequentemente, pelas várias e distintas funções celulares em que foi já implicada, bem como pelo vasto número de proteínas a que se liga (aproximadamente 50). Na comunidade científica, espera-se por isso que, nos próximos tempos, o seu espectro fenotípico venha a ser ainda mais alargado.

A última patologia a ser associada ao gene *VCP* foi a paraparésia espástica hereditária (SPG) (Bot *et al.*, 2012). Os autores colocaram a hipótese que este fenótipo se possa explicar pela interação da *VCP* com a strumpelina, uma proteína que é codificada pelo gene *KIAA0196* que, por sua vez, é responsável por um subtipo raro de SPG, a SPG8.

Talvez o fenótipo atípico deste doente se possa vir a explicar no futuro, quando se souber mais sobre as proteínas com as quais a *VCP* interage.

Uma linha de investigação que começou recentemente a ser seguida tenta compreender melhor o papel do *stress* do retículo endoplasmático (ER) e as tauopatias. Este organelo, de entre as suas várias funções, participa no *folding*, montagem e controlo de qualidade de proteínas. Quando em *stress*, as suas funções são comprometidas, dando-se a activação da *unfolded protein response* (UPR). O *stress* do ER origina, por uma cascata de eventos bioquímicos, fosforilação anormal da tau e sua dissociação dos microtúbulos. Nijholt *et al.* (2011) demonstraram que a UPR estava ativada num doente com o subtipo neuropatológico FTLT-tau e com mutação no gene *MAPT*.

O doente DFT13 tinha uma mutação no *VCP* e não no *MAPT*. Gitcho *et al.* (2009) demonstraram que mutações no *VCP* alteram a localização subcelular da TDP-43, originando *stress* do ER. Talvez possa ser esta a explicação de encontrarmos um doente com quadro clínico de DFT e uma mutação no gene *VCP*, quando habitualmente mutações neste gene estão associadas a outros fenótipos.

4. Pesquisa de grandes rearranjos nos genes *MAPT* e *GRN*

Nesta coorte de doentes portugueses com diagnóstico clínico de DFT, todas as amostras analisadas apresentaram valores compreendidos entre 0.75-1.25, indicando que esses doentes tinham um número de cópias normal destes 2 genes, pelo que os rearranjos nos genes *MAPT* e *GRN* não serão a causa de DFT nestes nossos doentes.

Ainda não foi descrita nenhuma instância deste mecanismo em doentes portugueses e são pouquíssimas as populações em que foi já investigada: uma coorte espanhola composta 70 doentes, com nenhum caso (Lladó *et al.*, 2007); uma coorte belga de 103 doentes, com identificação por PCR quantitativa de um doente com uma deleção de um segmento com 54 e 69 kb de comprimento que incluía o gene *GRN*, juntamente com 2 genes vizinhos *RUNDC3A* e *SLC25A39* (Gijssels *et al.*, 2008); uma série de 63 doentes franceses, com a identificação de um doente com deleção a partir de 88pb a montante do exão 2 até 7pb a montante do exão 13 do gene *GRN* por PCR multiplex quantitativo (QMPF) (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2008); e um grupo de 39 doentes (25 suecos e 14 americanos), sem qualquer deleção ou duplicação encontrada (Skoglund *et al.*, 2009).

Foram ainda feitas descrições de alguns casos isolados: um doente com uma microduplicação 17q21.31, que incluía a duplicação completa do gene *MAPT* (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2010); e um doente com uma deleção dos exões 6-9 no mesmo gene (Rovelet-Lecrux and Campion, 2009).

Apesar de serem poucos, os estudos que foram realizados sobre a possibilidade de grandes rearranjos serem causadores de DFT apresentaram uma frequência que ronda os 0-1%, o que permite especular que os rearranjos na região 17q21 não serão causa frequente de DFT. A ausência destes eventos na coorte de 67 doentes portugueses com DFT é mais um facto a apoiar esta teoria.

5. A baixa frequência de mutações encontradas em doentes portugueses com DFT e as limitações deste estudo

Resumindo, encontrámos apenas uma mutação nos 67 doentes estudados, ou seja, uma taxa de confirmação molecular de 1,5%.

A falta de confirmação genética do diagnóstico clínico nos restantes doentes pode ser explicada pelas limitações da abordagem estratégica seguida: os genes estudados em cada doente foram limitados pelo pedido do médico, que por sua vez estavam limitados apenas aos genes *MAPT*, *GRN* e *VCP* (o estudo dos genes *CHMP2B* e *C9orf72* não está ainda implementado no CGPP, IBMC).

Por outro lado, a própria estratégia seguida na sequenciação (estudo das regiões codificantes e intrónicas flanqueantes dos genes *MAPT*, *GRN* e *VCP*) apresenta limitações. As regiões intrónicas mais distantes e a região promotora, bem como outros elementos reguladores, não puderam ser alvo deste estudo. Nelas poderão residir mutações causadoras de DFT, como é o caso de duas mutações já descritas, no gene *GRN*: IVS0+3 A>T (Le Ber *et al.*, 2007) e IVS0+5 G>C (Cruts *et al.*, 2006).

Também a abordagem bioinformática seguida na previsão do efeito das 6 novas variantes encontradas, bem como a ausência de DNA de familiares para estudos de segregação, poderão estar a subestimar a frequência de verdadeiras mutações encontradas nesta coorte de doentes, que aqui desse modo foram tomadas como variantes de significado desconhecido ou mesmo como polimorfismos.

Pelas razões acima mencionadas, não é possível tirar conclusões acerca da frequência de mutações. No entanto, os resultados obtidos parecem indicar que as mutações conhecidas e os genes estudados contribuirão pouco para a DFT em doentes portugueses e que existirão, portanto, outras causas genéticas (outros genes e/ou outro tipo de mutações) para a DFT nestes doentes.

VI. Conclusões

A demência frontotemporal é uma doença neurodegenerativa com um fenótipo heterogéneo, associada já a mutações em cinco genes diferentes.

Este estudo permitiu:

- Implementar o diagnóstico molecular de DFT no CGPP, IBMC;
- Excluir que as mutações nos genes *MAPT*, *GRN* e *VCP*, bem como os grandes rearranjos nos genes *MAPT* e *GRN* não são causa *major* de DFT nos doentes portugueses;
- Estender o espectro mutacional dos doentes portugueses com DFT, com a descoberta de uma nova mutação no *VCP*;
- Alargar o espectro clínico de doenças associadas a mutações nesse gene.

O diagnóstico molecular de DFT é importante para a confirmação do diagnóstico clínico e mais importante ainda para efeitos de aconselhamento genético aos doentes e familiares em risco.

Uma vez que foi identificada a mutação causadora da doença num dos probandos, pode ser oferecido um teste pré-sintomático aos seus familiares em risco que o desejarem, em contexto de aconselhamento genético.

VII. Perspetivas para o futuro

Os estudos realizados vieram abrir as seguintes possibilidades de estudos futuros:

- Completar o rastreio de mutações nos doentes para os quais não foram estudados todos os 3 genes disponíveis no CGPP, IBMC;
- Implementar o estudo dos genes *CHMP2B* e *C9orf72* no CGPP, IBMC;
- Continuar a procurar outras causas genéticas de DFT em doentes portugueses e outros;
- Continuar a estudar o papel do *stress* do ER nas tauopatias.

VIII. Bibliografia

Badadani M, Nalbandian A, Watts GD, Vesa J, Kitazawa M, Su H, Tanaja J, Dec E, Wallace DC, Mukherjee J, Caiozzo V, Warman M, Kimonis VE. VCP associated inclusion body myopathy and paget disease of bone knock-in mouse model exhibits tissue pathology typical of human disease. *PLoS One*. 2010 Oct 5;5(10): e13183.

Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey CA, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H, Hutton M. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*. 2006 Aug 24;442(7105):916-9.

Brandt R, Hundelt M, Shahani N. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jan 3;1739(2-3):331-54.

Chester C, de Carvalho M, Miltenberger G, Pereira S, Dillen L, van der Zee J, van Broeckhoven C, de Mendonça A. Rapidly progressive frontotemporal dementia and bulbar amyotrophic lateral sclerosis in Portuguese patients with C9orf72 mutation. *Amyotroph Lateral Scler*. 2012 Jun 29.

Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, Rademakers R, Vandenberghe R, Dermaut B, Martin JJ, van Duijn C, Peeters K, Sciot R, Santens P, De Pooter T, Mattheijssens M, Van den Broeck M, Cuijt I, Vennekens K, De Deyn PP, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*. 2006 Aug 24;442(7105):920-4.

Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat*. 2012 Sep;33(9):1340-4.

de Bot ST, Schelhaas HJ, Kamsteeg EJ, van de Warrenburg BP. Hereditary spastic paraplegia caused by a mutation in the VCP gene. *Brain*. 2012 Sep 18.

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):245-56.

D'Souza I, Poorkaj P, Hong M, Nochlin D, Lee VM, Bird TD, Schellenberg GD. Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 11;96(10):5598-603.

Ferrari R, Hardy J, Momeni P. Frontotemporal dementia: from Mendelian genetics towards genome wide association studies. *J Mol Neurosci*. 2011 Nov;45(3):500-15.

Gallo M, Tomaino C, Puccio G, Frangipane F, Curcio SA, Bernardi L, Geracitano S, Anfossi M, Mirabelli M, Colao R, Vasso F, Smirne N, Maletta RG, Bruni AC. Novel MAPT Val75Ala mutation and PSEN2 Arg62His in two siblings with frontotemporal dementia. *Neurol Sci.* 2010 Feb;31(1):65-70.

Gijselink I, van der Zee J, Engelborghs S, Goossens D, Peeters K, Mattheijssens M, Corsmit E, Del-Favero J, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Cruts M. Progranulin locus deletion in frontotemporal dementia. *Hum Mutat.* 2008 Jan;29(1):53-8.

Gitcho MA, Strider J, Carter D, Taylor-Reinwald L, Forman MS, Goate AM, Cairns NJ. VCP mutations causing frontotemporal lobar degeneration disrupt localization of TDP-43 and induce cell death. *J Biol Chem.* 2009 May 1;284(18):12384-98.

Goedert M. Tau gene mutations and their effects. *Mov Disord.* 2005 Aug;20 Suppl 12:S45-52.

Goedert M, Jakes R. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jan 3;1739(2-3):240-50.

Goode BL, Chau M, Denis PE, Feinstein SC. Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease. *J Biol Chem.* 2000 Dec 8;275(49):38182-9.

Grossman M. Primary progressive aphasia: clinicopathological correlations. *Nat Rev Neurol.* 2010 Feb;6(2):88-97.

Guerreiro RJ, Santana I, Bras JM, Revesz T, Rebelo O, Ribeiro MH, Santiago B, Oliveira CR, Singleton A, Hardy J. Novel progranulin mutation: screening for PGRN mutations in a Portuguese series of FTD/CBS cases. *Mov Disord.* 2008 Jul 15;23(9):1269-73.

Guimarães J, Fonseca R, Garret C (2006) DEMÊNCIA FRONTOTEMPORAL Que Entidade?. *Acta Med Port* 19: 319-324.

Hernández F, Avila J. Tauopathies. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Sep;64(17):2219-33.

Hutton M. Molecular genetics of chromosome 17 tauopathies. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;920:63-73.

Ju JS, Fuentealba RA, Miller SE, Jackson E, Piwnicka-Worms D, Baloh RH, Weihl CC. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J Cell Biol.* 2009 Dec 14;187(6):875-88.

Koppers M, van Blitterswijk MM, Vlam L, Rowicka PA, van Vught PW, Groen EJ, Spliet WG, Engelen-Lee J, Schelhaas HJ, de Visser M, van der Kooi AJ, van der Pol WL, Pasterkamp RJ, Veldink JH, van den Berg LH. VCP mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2012 Apr;33(4):837.e7-13.

Kowalska A. The genetics of dementias. Part 1: Molecular basis of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2009 Jun 15;63:278-86.

Le Ber I, van der Zee J, Hannequin D, Gijselinck I, Campion D, Puel M, Laquerrière A, De Pooter T, Camuzat A, Van den Broeck M, Dubois B, Sella F, Lacomblez L, Vercelletto M, Thomas-Antérion C, Michel BF, Golfier V, Didic M, Salachas F, Duyckaerts C, Cruts M, Verpillat P, Van Broeckhoven C, Brice A; French Research Network on FTD/FTD-MND. Progranulin null mutations in both sporadic and familial frontotemporal dementia. *Hum Mutat.* 2007 Sep;28(9):846-55.

Lladó A, Rodríguez-Santiago B, Antonell A, Sánchez-Valle R, Molinuevo JL, Reñé R, Pérez-Jurado LA. MAPT gene duplications are not a cause of frontotemporal lobar degeneration. *Neurosci Lett.* 2007 Aug 31;424(1):61-5.

Ludolph AC, Kassubek J, Landwehrmeyer BG, Mandelkow E, Mandelkow EM, Burn DJ, Caparros-Lefebvre D, Frey KA, de Yebenes JG, Gasser T, Heutink P, Höglinger G, Jamrozik Z, Jellinger KA, Kazantsev A, Kretschmar H, Lang AE, Litvan I, Lucas JJ, McGeer PL, Melquist S, Oertel W, Otto M, Paviour D, Reum T, Saint-Raymond A, Steele JC, Tolnay M, Tuman H, van Swieten JC, Vanier MT, Vonsattel JP, Wagner S, Wszolek ZK. Tauopathies with parkinsonism: clinical spectrum, neuropathologic basis, biological markers, and treatment options. *Eur J Neurol.* 2009 Mar;16(3):297-309.

Mackenzie IR, Rademakers R. The molecular genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration: recent developments. *Neurogenetics.* 2007 Nov;8(4):237-48.

Munoz DG, Dickson DW, Bergeron C, Mackenzie IR, Delacourte A, Zhukareva V. The neuropathology and biochemistry of frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 2003;54 Suppl 5:S24-8.

Neumann M, Tolnay M, Mackenzie IR. The molecular basis of frontotemporal dementia. *Expert Rev Mol Med.* 2009 Jul 29;11:e23.

Neumann M. Frontotemporal dementia. *Orphanet Encyclopedia.* July 2004.

Pickering-Brown SM, Baker M, Gass J, Boeve BF, Loy CT, Brooks WS, Mackenzie IR, Martins RN, Kwok JB, Halliday GM, Kril J, Schofield PR, Mann DM, Hutton M. Mutations in progranulin explain atypical phenotypes with variants in MAPT. *Brain.* 2006 Nov;129(Pt 11):3124-6.

Poorkaj P, Grossman M, Steinbart E, Payami H, Sadovnick A, Nochlin D, Tabira T, Trojanowski JQ, Borson S, Galasko D, Reich S, Quinn B, Schellenberg G, Bird TD. Frequency of tau gene mutations in familial and sporadic cases of non-Alzheimer dementia. *Arch Neurol.* 2001 Mar;58(3):383-7.

Rabinovici GD, Miller BL. Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs.* 2010 May;24(5):375-98.

Rademakers R, Eriksen JL, Baker M, Robinson T, Ahmed Z, Lincoln SJ, Finch N, Rutherford NJ, Crook RJ, Josephs KA, Boeve BF, Knopman DS, Petersen RC, Parisi JE, Caselli RJ, Wszolek ZK, Uitti RJ, Feldman H, Hutton ML, Mackenzie IR, Graff-Radford NR, Dickson DW. Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet.* 2008 Dec 1;17(23):3631-42.

Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology.* 2002 Jun 11;58(11):1615-21.

Rohrer JD, Lashley T, Schott JM, Warren JE, Mead S, Isaacs AM, Beck J, Hardy J, de Silva R, Warrington E, Troakes C, Al-Sarraj S, King A, Borroni B, Clarkson MJ, Ourselin S, Holton JL, Fox NC, Revesz T, Rossor MN, Warren JD. Clinical and neuroanatomical signatures of tissue pathology in frontotemporal lobar degeneration. *Brain*. 2011 Sep;134(Pt 9):2565-81.

Rollinson S, Rohrer JD, van der Zee J. No association of PGRN 3'UTR rs5848 in frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiol Aging* 2011;32:754e5.

Rosso SM, Donker Kaat L, Baks T, Joosse M, de Koning I, Pijnenburg Y, de Jong D, Dooijes D, Kamphorst W, Ravid R, Niermeijer MF, Verheij F, Kremer HP, Scheltens P, van Duijn CM, Heutink P, van Swieten JC. Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain*. 2003 Sep;126(Pt 9):2016-22.

Rosso, Sonia M.; van Swieten, John C. New developments in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Curr Opin Neurol*. 2002 Aug;15(4):423-8.

Rovelet-Lecrux A, Deramecourt V, Legallic S, Maurage CA, Le Ber I, Brice A, Lambert JC, Frébourg T, Hannequin D, Pasquier F, Campion D. Deletion of the progranulin gene in patients with frontotemporal lobar degeneration or Parkinson disease. *Neurobiol Dis*. 2008 Jul;31(1):41-5.

Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Guillin O, Legallic S, Jurici S, Wallon D, Frebourg T, Campion D. Frontotemporal dementia phenotype associated with MAPT gene duplication. *J Alzheimers Dis*. 2010;21(3):897-902.

Rovelet-Lecrux A, Lecourtois M, Thomas-Anterion C, Le Ber I, Brice A, Frebourg T, Hannequin D, Campion D. Partial deletion of the MAPT gene: a novel mechanism of FTDP-17. *Hum Mutat*. 2009 Apr;30(4):E591-602.

Scarpini E, Galimberti D, Bresolin N. Genetics and neurobiology of frontotemporal lobar degeneration. *Neurol Sci*. 2006 Mar;27 Suppl 1:S32-4.

Shaw CE. Capturing VCP: another molecular piece in the ALS jigsaw puzzle. *Neuron*. 2010 Dec 9;68(5):812-4.

Simón-Sánchez J, Seelaar H, Bochtanovits Z, Deeg DJ, van Swieten JC, Heutink P. Variation at GRN 3'-UTR rs5848 is not associated with a risk of frontotemporal lobar degeneration in Dutch population. *PLoS One*. 2009 Oct 22;4(10):e7494.

Skoglund L, Ingvast S, Matsui T, Freeman SH, Frosch MP, Brundin R, Giedraitis V, Growdon JH, Hyman BT, Lannfelt L, Ingelsson M, Glaser A. No evidence of PGRN or MAPT gene dosage alterations in a collection of patients with frontotemporal lobar degeneration. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009;28(5):471-5.

Snowden JS, Hu Q, Rollinson S, Halliwell N, Robinson A, Davidson YS, Momeni P, Baborie A, Griffiths TD, Jaros E, Perry RH, Richardson A, Pickering-Brown SM, Neary D, Mann DM. The most common type of FTL-D-FUS (aFTLD-U) is associated with a distinct clinical form of frontotemporal dementia but is not related to mutations in the FUS gene. *Acta Neuropathol*. 2011 Jul;122(1):99-110.

Stanford PM, Shepherd CE, Halliday GM, Brooks WS, Schofield PW, Brodaty H, Martins RN, Kwok JB, Schofield PR. Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia. *Brain*. 2003 Apr;126(Pt 4):814-26.

Taipa R, Tuna A, Damásio J, Pinto PS, Cavaco S, Pereira S, Milterberger-Miltenyi G, Galimberti D, Melo-Pires M. Clinical, neuropathological, and genetic characteristics of the novel IVS9+1delG GRN mutation in a patient with frontotemporal dementia. *J Alzheimers Dis*. 2012;30(1):83-90.

Tolnay M, Grazia Spillantini M, Rizzini C, Eccles D, Lowe J, Ellison D. A new case of frontotemporal dementia and parkinsonism resulting from an intron 10 +3-splice site mutation in the tau gene: clinical and pathological features. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2000 Aug;26(4):368-78.

Van Damme P, Van Hoecke A, Lambrechts D, Vanacker P, Bogaert E, van Swieten J, Carmeliet P, Van Den Bosch L, Robberecht W. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J Cell Biol*. 2008 Apr 7;181(1):37-41.

Van Deerlin VM, Gill LH, Farmer JM, Trojanowski JQ, Lee VM. Familial frontotemporal dementia: from gene discovery to clinical molecular diagnostics. *Clin Chem*. 2003 Oct;49(10):1717-25.

van Swieten JC, Heutink P. Mutations in progranulin (GRN) within the spectrum of clinical and pathological phenotypes of frontotemporal dementia. *Lancet Neurol*. 2008 Oct;7(10):965-74.

Wehl CC. Valosin containing protein associated fronto-temporal lobar degeneration: clinical presentation, pathologic features and pathogenesis. *Curr Alzheimer Res*. 2011 May;8(3):252-60.

IX. Anexos

Anexo 1 – cDNA do gene *MAPT* (NM_001123066.v3)

1 ATGGCTTCTGGAGCCGATTCAAAAGGTGATGACCTATCAACAGCCATTCTCAAACAGAAG
1 -M--A--S--G--A--D--S--K--G--D--D--L--S--T--A--I--L--K--Q--K--
61 AACCGTCCC AATCGGTTAATTGTTGATGAAGCCATCAATGAGGACAACAGTGTGGTGTC
21 -N--R--P--N--R--L--I--V--D--E--A--I--N--E--D--N--S--V--V--S--
121 TTGTCCAGCCC AAGATGGATGAATTGCAGTTGTTCCGAGGTGACACAGTGTTGCTGAAA
41 -L--S--Q--P--K--M--D--E--L--Q--L--F--R--G--D--T--V--L--L--K--
181 GGAAAGAAGAGACGAGAAGCTGTTTGCATCGTCTTTCTGATGATACTTGTCTGATGAG
61 -G--K--K--R--R--E--A--V--C--I--V--L--S--D--D--T--C--S--D--E--
241 AAGATTTCGGATGAATAGAGTTGTTTCGGAATAACCTTCGTGTACGCCTAGGGGATGTCATC
81 -K--I--R--M--N--R--V--V--R--N--N--L--R--V--R--L--G--D--V--I--
301 AGCATCCAGCCATGCTCTGATGTGAAGTACGGCAACAGTATCCATGTGCTGCCCATTGAT
101 -S--I--Q--P--C--P--D--V--K--Y--G--K--R--I--H--V--L--P--I--D--
361 GACACAGTGGAAGGCATTACTGGTAATCTCTTCGAGGTATACCTTAAGCCGTACTTCCTG
121 -D--T--V--E--G--I--T--G--N--L--F--E--V--Y--L--K--P--Y--F--L--
421 GAAGCGTATCGACCCATCCGGAAGGAGACATTTTCTTGTCCGTGGTGGGATGCGTGCT
141 -E--A--Y--R--P--I--R--K--G--D--I--F--L--V--R--G--G--M--R--A--
481 GTGGAGTTCAAAGTG GTGGAAACAGATCCTAGCCCTTATGTCATTGTTGCTCCAGACACA
161 -V--E--F--K--V--V--E--T--D--P--S--P--Y--C--I--V--A--P--D--T--
541 GTGATCCACTGCGAAGGGGAGCCTATCAACGAGAGGATGAGGAAGAGTCC TTGAATGAA
181 -V--I--H--C--E--G--E--P--I--K--R--E--D--E--E--E--S--L--N--E--
601 GTAGGGTATGATGACATTGGTGGCTGCAGGAAGCAGCTAGCTCAGATAAAGGAGATGGTG
201 -V--G--Y--D--D--I--G--G--C--R--K--Q--L--A--Q--I--K--E--M--V--
661 GAACTGCCCCCTGAGACATCCTGCCCTCTTTAAGGCAATTGGTGTGAAGCCTCCTAGAGGA
221 -E--L--P--L--R--H--P--A--L--F--K--A--I--G--V--K--P--P--R--G--
721 ATCCTGCTTTACGGACCTCCTGGAACAGGAAAGACCCTGATTGCTCGAGCTGTAGCAAAT
241 -I--L--L--Y--G--P--P--G--T--G--K--T--L--I--A--R--A--V--A--N--
781 GAGACTGGAGCCTTCTTCTTCTTGATCAATGGTCCTGAGATCATGAGCAAATTGGCTGGT
261 -E--T--G--A--F--F--F--L--I--N--G--P--E--I--M--S--K--L--A--G--
841 GAGTCTGAGAGCAACCTTCGTAAAGCCTTTGAGGAGGCTGAGAAGAATGCTCCTGCCATC
281 -E--S--E--S--N--L--R--K--A--F--E--E--A--E--K--N--A--P--A--I--
901 ATCTTCATTGATGAGCTAGATGCCATCGCTCCC AAAAGAGAGAAA ACTCATGGCGAGGTG
301 -I--F--I--D--E--L--D--A--I--A--P--K--R--E--K--T--H--G--E--V--
961 GAGCGGCGCATTTGATCAGTTGTTGACCTCATGGATGGCCTAAGCAGAGGGCACAT
321 -E--R--R--I--V--S--Q--L--L--T--L--M--D--G--L--K--Q--R--A--H--
1021 GTGATTGTTATGGCAGCAACCAACAGACCAACAGCATTGACCCAGCTCTACGGCGATTT
341 -V--I--V--M--A--A--T--N--R--P--N--S--I--D--P--A--L--R--R--F--

1081 GGT**CGCTTTGACAGG**GAGGTAGATATT**GGAATTCTGATGCTACAGG**CGCTTAGAGATT
361 -G--R--F--D--R--E--V--D--I--G--I--P--D--A--T--G--R--L--E--I--
1141 CTT**CAGATCCATACCAAGAACATGAAGCTGGCAGATGATGTGGACCTGGAACAGG**TAGGCC
381 -L--Q--I--H--T--K--N--M--K--L--A--D--D--V--D--L--E--Q--V--A--
1201 AAT**GAGACTCACGGGCATGTGGGTGCTGACTTAGCAGCCCTGTGCTCAGAGGCTGCTCTG**
401 -N--E--T--H--G--H--V--G--A--D--L--A--A--L--C--S--E--A--A--L--
1261 CAAGCCATCC**CGCAAGAAGATGGATCTCATTGACCTAGAGGATGAGACCATTGATGCCGAG**
421 -Q--A--I--R--K--K--M--D--L--I--D--L--E--D--E--T--I--D--A--E--
1321 GTC**ATGAAC**TCTCTA**GCAGTTACTATGGATGACTTCCGGTGGGCCTTGAGCCAGAGTAAC**
441 -V--M--N--S--L--A--V--T--M--D--D--F--R--W--A--L--S--Q--S--N--
1381 CCAT**CAGCACTGCGG**GAAACCGTGGTAGAGGTG**CCACAGGTAACCTGGGAAGACATCGGG**
461 -P--S--A--L--R--E--T--V--V--E--V--P--Q--V--T--W--E--D--I--G--
1441 GGCCTAGAGGATGTC**AAACGTGAGCTACAGGAGCTGGTCCAGTATCCTGTGGAGCACCCA**
481 -G--L--E--D--V--K--R--E--L--Q--E--L--V--Q--Y--P--V--E--H--P--
1501 GAC**AAATTCCTGAAGTTTGGCATGACACCTTCCAAGGGAGTTCTGTTCTATGGACCTCCT**
501 -D--K--F--L--K--F--G--M--T--P--S--K--G--V--L--F--Y--G--P--P--
1561 GGCT**TGTGGGAAA**ACTTTGTTGGCC**AAAGCCATTGCTAATGAATGC**CAGGCC**AACTTCATC**
521 -G--C--G--K--T--L--L--A--K--A--I--A--N--E--C--Q--A--N--F--I--
1621 TCCATCAAGGGT**CCTGAGCTGCTACCATGTGGTTTGGGGAGTCTGAGGCCAATGTCAGA**
541 -S--I--K--G--P--E--L--L--T--M--W--F--G--E--S--E--A--N--V--R--
1681 GAAATCTTT**GACAAGGCCCGCAAGCTGCCCCCTGTGTGCTATTCTTTGATGAGCTGGAT**
561 -E--I--F--D--K--A--R--Q--A--A--P--C--V--L--F--F--D--E--L--D--
1741 TCGATTGCC**AAGGCTCGTGGAGGTAACATTGGAGATGGTGGTGGGGCTGCTGACCGAGTC**
581 -S--I--A--K--A--R--G--G--N--I--G--D--G--G--G--A--A--D--R--V--
1801 ATCAACCAGAT**CCTGACAGAAATGGATGGCATGTCCACAAAAAAATGTGTTTCATCATT**
601 -I--N--Q--I--L--T--E--M--D--G--M--S--T--K--K--N--V--F--I--I--
1861 GGC**GCTACCAACCGGCCTGACATCATTGATCCTGCCATCCTCAGACCTGGCCGTCTTGAT**
621 -G--A--T--N--R--P--D--I--I--D--P--A--I--L--R--P--G--R--L--D--
1921 CAG**CTCATCTACATCCACTTCCTGATGAGAAGTCCCGTGTTGCCATCCTCAAGGCTAAC**
641 -Q--L--I--Y--I--P--L--P--D--E--K--S--R--V--A--I--L--K--A--N--
1981 CTGCGCAAG**TCC**CAGTTGCC**AAGGATGTGGACTTGGAGTTCCTGCT**AAAAATGACTAAT
661 -L--R--K--S--P--V--A--K--D--V--D--L--E--F--L--A--K--M--T--N--
2041 GGCT**TCTCTGGAGCTGACCTGACAGAGATTGCCAGCGTGCTTGCAAGCTGGCCATCCGT**
681 -G--F--S--G--A--D--L--T--E--I--C--Q--R--A--C--K--L--A--I--R--
2101 GAATCCATC**GAGAGTGAGATTAGGCGA**GAA**CGAGAGAGGCAGACA**AA**CCATCAGCCATG**
701 -E--S--I--E--S--E--I--R--R--E--R--E--R--Q--T--N--P--S--A--M--
2161 GAGGTAGAAG**GAGGATGATCCAGTGCCTGAGATCCGTCGAGATCAC**TTTGAAGAAGCCATG
721 -E--V--E--E--D--D--P--V--P--E--I--R--R--D--H--F--E--E--A--M--

2221 CGCTTTGCGCGCCGTCTGTGTCAGTGACAAATGACATTCGGAAGTATGAGATGTTTGCCCAG
 741 -R--F--A--R--R--S--V--S--D--N--D--I--R--K--Y--E--M--F--A--Q--
 2281 ACCCTTCAGCAGAGTCGGGGCTTTGGCAGCTTCAGATTCCCTTCAGGGAACCAGGGTGGA
 761 -T--L--Q--Q--S--R--G--F--G--S--F--R--F--P--S--G--N--Q--G--G--
 2341 GCTGGCCCCAGTCAGGGCAGTGGAGGCGGCACAGGTGGCAGTGTATACACAGAAGACAAT
 781 -A--G--P--S--Q--G--S--G--G--G--T--G--G--S--V--Y--T--E--D--N--
 2401 GATGATGACCTGTATGGCTAA
 801 -D--D--D--L--Y--G--*-

Anexo 2 - cDNA do gene *GRN* (NM_002087.v2)

```
1 ATGTGGACCTGGTGAGCTGGGTGGCCTTAACAGCAGGGCTGGTGCTGGAACGCGGTGC
1 -M--W--T--L--V--S--W--V--A--L--T--A--G--L--V--A--G--T--R--C--
61 CCAGATGGTCAGTTCTGCCCTGTGGCCTGCTGCCTGGACCCGGAGGAGCCAGCTACAGC
21 -P--D--G--Q--F--C--P--V--A--C--C--L--D--P--G--G--A--S--Y--S--
121 TGC TGCCGTCCCCTTCTGGACAAATGGCCACAACACTGAGCAGGCATCTGGGTGGCCCC
41 -C--C--R--P--L--L--D--K--W--P--T--T--L--S--R--H--L--G--G--P--
181 TGC CAGGTTGATGCCCACTGCTCTGCCGGCCACTCCTGCATCTTTACCGTCTCAGGGACT
61 -C--Q--V--D--A--H--C--S--A--G--H--S--C--I--F--T--V--S--G--T--
241 TCCAGTTGCTGCCCTTCCCAGAGGCCGTGGCATGCGGGGATGGCCATCACTGCTGCCCA
81 -S--S--C--C--P--F--P--E--A--V--A--C--G--D--G--H--H--C--C--P--
301 CGGGGCTTCCACTGTCAGTGCAGACGGGCGATCCCTGCTTCCAAAGATCAGGTAACAACGCC
101 -R--G--F--H--C--S--A--D--G--R--S--C--F--Q--R--S--G--N--N--S--
361 GTGGGTGCCATCCAGTGCCCTGATAGTCAGTTCTGAATGCCCGGACTTCTCCACGTGCTGT
121 -V--G--A--I--Q--C--P--D--S--Q--F--E--C--P--D--F--S--T--C--C--
421 GTTATGGTTCGATGGCTCCTGGGGTGCTGCCCCATGCCCCAGGCTCCTGCTGTTGAAGAC
141 -V--M--V--D--G--S--W--G--C--C--P--M--P--Q--A--S--C--C--E--D--
481 AGGGTGCACTGCTGTCCGCACGGTGCCCTTCTGCGACCTGGTTCACACCCGCTGCATCACA
161 -R--V--H--C--C--P--H--G--A--F--C--D--L--V--H--T--R--C--I--T--
541 CCCACGGGCACCCACCCCCTGGCAAAGAAGCTCCCTGCCCAGAGGACTAACAGGGCAGTG
181 -P--T--G--T--H--P--L--A--K--K--L--P--A--Q--R--T--N--R--A--V--
601 GCCTTGTCCAGCTCGGTGTCATGTGTCCGACGCACGGTCCCGGTGCCCTGATGGTTCTACC
201 -A--L--S--S--S--V--M--C--P--D--A--R--S--R--C--P--D--G--S--T--
661 TGCTGTGAGCTGCCCAGTGGGAAGTATGGCTGCTGCCCAATGCCAACGCCACCTGCTGCG
221 -C--C--E--L--P--S--G--K--Y--G--C--C--P--M--P--N--A--T--C--C--
721 TCCGATCACCTGCACTGCTGCCCCAAGACACTGTGTGTGACCTGATCCAGAGTAAGTGC
241 -S--D--H--L--H--C--C--P--Q--D--T--V--C--D--L--I--Q--S--K--C--
781 CTCTCCAAGGAGAACGCTACCACGGACCTCCTCCTAAGCTGCCTGCGCACACAGTGGGG
261 -L--S--K--E--N--A--T--T--D--L--L--T--K--L--P--A--H--T--V--G--
841 GATGTGAAATGTGACATGGAGGTGAGCTGCCCAGATGGCTATACCTGCTGCCGTCTACAG
281 -D--V--K--C--D--M--E--V--S--C--P--D--G--Y--T--C--C--R--L--Q--
901 TCGGGGGCCTGGGGCTGCTGCCCTTTTACCCAGGCTGTGTGCTGTGAGGACCACATACAC
301 -S--G--A--W--G--C--C--P--F--T--Q--A--V--C--C--E--D--H--I--H--
961 TGCTGTCCCGCGGGGTTTACGTGTGACACGCAGAAAGGGTACCTGTGAACAGGGGCCCCAC
321 -C--C--P--A--G--F--T--C--D--T--Q--K--G--T--C--E--Q--G--P--H--
1021 CAGGTGCCCCGGGATGGAGAAGGCCCAAGCTCACCTCAGCCTGCCAGACCCACAAGCCTTG
341 -Q--V--P--W--M--E--K--A--P--A--H--L--S--L--P--D--P--Q--A--L--
1081 AAGAGAGATGTCCCCGTGATAAATGTCAGCAGCTGTCCCTCCTCCGATACCTGCTGCCAA
361 -K--R--D--V--P--C--D--N--V--S--S--C--P--S--S--D--T--C--C--Q--
```


Anexo 3 – cDNA do gene VCP (NM_007126.v3)

```
1 ATGGCTTCTGGAGCCGATTCAAAAGGTGATGACCTATCAACAGCCATTCTCAAACAGAAG
1 -M--A--S--G--A--D--S--K--G--D--D--L--S--T--A--I--L--K--Q--K--

61 AACCGTCCC AATCGGTTAATTGTTGATGAAGCCATCAATGAGGACAACAGTGTGGTGTC
21 -N--R--P--N--R--L--I--V--D--E--A--I--N--E--D--N--S--V--V--S--

121 TTGTCCCGAGCCCAAGATGGATGAATTGCAGTTGTTCCGAGGTGACACAGTGTGCTGAAA
41 -L--S--Q--P--K--M--D--E--L--Q--L--F--R--G--D--T--V--L--L--K--

181 GGAAAGAAGAGACGAGAAGCTGTTTGCATCGTCCTTTCTGATGATACTTGTCTGATGAG
61 -G--K--K--R--R--E--A--V--C--I--V--L--S--D--D--T--C--S--D--E--

241 AAGATTTCGGATGAATAGAGTTGTTCCGAATAACCTTCGTGTACGCCTAGGGGATGTCATC
81 -K--I--R--M--N--R--V--V--R--N--N--L--R--V--R--L--G--D--V--I--

301 AGCATCCAGCCATGCTCTGATGTGAAGTACGGCAAACGTATCCATGTGCTGCCCATTGAT
101 -S--I--Q--P--C--P--D--V--K--Y--G--K--R--I--H--V--L--P--I--D--

361 GACACAGTGGAAAGGCATTACTGGTAATCTCTTCGAGGTATACCTTAAGCCGTACTTCCTG
121 -D--T--V--E--G--I--T--G--N--L--F--E--V--Y--L--K--P--Y--F--L--

421 GAAGCGTATCGACCCATCCGGAAGGAGACATTTTCTTGTCCGTGGTGGGATGCGTGCT
141 -E--A--Y--R--P--I--R--K--G--D--I--F--L--V--R--G--G--M--R--A--

481 GTGGAGTTCAAAGTGTTGGAAACAGATCCTAGCCCTTATGTCATTGTTGCTCCAGACACA
161 -V--E--F--K--V--V--E--T--D--P--S--P--Y--C--I--V--A--P--D--T--

541 GTGATCCACTGCGAAGGGGAGCCTATCAAACGAGAGGATGAGGAAGAGTCCTTGAATGAA
181 -V--I--H--C--E--G--E--P--I--K--R--E--D--E--E--E--S--L--N--E--

601 GTAGGGTATGATGACATTGGTGGCTGCGAGGAAGCAGCTAGCTCAGATAAAGGAGATGGTG
201 -V--G--Y--D--D--I--G--G--C--R--K--Q--L--A--Q--I--K--E--M--V--

661 GAACTGCCCCCTGAGACATCCTGCCCTCTTTAAGGCAATTGGTGTGAAGCCTCCTAGAGGA
221 -E--L--P--L--R--H--P--A--L--F--K--A--I--G--V--K--P--P--R--G--

721 ATCCTGCTTTACGGACCTCCTGGAACAGGAAGACCCTGATTGCTCGAGCTGTAGCAAAT
241 -I--L--L--Y--G--P--P--G--T--G--K--T--L--I--A--R--A--V--A--N--

781 GAGACTGGAGCCTTCTTCTTCTTGATCAATGGTCCTGAGATCATGAGCAAATTGGCTGGT
261 -E--T--G--A--F--F--F--L--I--N--G--P--E--I--M--S--K--L--A--G--

841 GAGTCTGAGAGCAACCTTCGTAAAGCCTTTGAGGAGGCTGAGAAGAATGCTCCTGCCATC
281 -E--S--E--S--N--L--R--K--A--F--E--E--A--E--K--N--A--P--A--I--

901 ATCTTCATTGATGAGCTAGATGCCATCGCTCCCAAAAGAGAGAAAACCTCATGGCGAGGTG
301 -I--F--I--D--E--L--D--A--I--A--P--K--R--E--K--T--H--G--E--V--

961 GAGCGGCGCATTGTATCACAGTTGTTGACCCTCATGGATGGCCTAAAGCAGAGGGGCACAT
321 -E--R--R--I--V--S--Q--L--L--T--L--M--D--G--L--K--Q--R--A--H--

1021 GTGATTGTTATGCGACGAACCAACAGACCAACAGCATTGACCCAGCTCTACGCGGATTT
341 -V--I--V--M--A--A--T--N--R--P--N--S--I--D--P--A--L--R--R--F--

1081 GGTGCTTTTGACAGGGAGGTAGATATTGGAATTCCTGATGCTACAGGACGCTTAGAGATT
361 -G--R--F--D--R--E--V--D--I--G--I--P--D--A--T--G--R--L--E--I--
```


1141 CTT**CAGATC**CATACC**AAGAACATGAAGCTGGCAGATGATGTGGACCTGGAACAGGTAGCC**
 381 -L--Q--I--H--T--K--N--M--K--L--A--D--D--V--D--L--E--Q--V--A--
 1201 AAT**GAGACTCACGGGCATGTGGTGCTGACTTAGCAGCCCTGTGCTCAGAGGCTGCTCTG**
 401 -N--E--T--H--G--H--V--G--A--D--L--A--A--L--C--S--E--A--A--L--
 1261 CAAGCCATCCGC**AAGAAGATGGATCTCATTGACCTAGAGGATGAGACCATTGATGCCGAG**
 421 -Q--A--I--R--K--K--M--D--L--I--D--L--E--D--E--T--I--D--A--E--
 1321 GTC**ATGAAC**TCTCTAG**GCAGTTACTATGGATGACTTTCCGGTGGGCCTTGAGCCAGAGTAAC**
 441 -V--M--N--S--L--A--V--T--M--D--D--F--R--W--A--L--S--Q--S--N--
 1381 CCAT**CAGCACTGCGGAAAACCGTGGTAGAGGTGCCACAGGTAACCTGGGAAGACATCGGG**
 461 -P--S--A--L--R--E--T--V--V--E--V--P--Q--V--T--W--E--D--I--G--
 1441 GGCCTAGAGGATGTC**AAACGTGAGCTACAGGAGCTGGTCCAGTATCCTGTGGAGCACCCA**
 481 -G--L--E--D--V--K--R--E--L--Q--E--L--V--Q--Y--P--V--E--H--P--
 1501 GAC**AAATTCCTGAAGTTTGGCATGACACCTTCCAAGGGAGTTCTGTTCTATGGACCTCCT**
 501 -D--K--F--L--K--F--G--M--T--P--S--K--G--V--L--F--Y--G--P--P--
 1561 GGC**TGTGGGAAA**ACTTTGTTGGCC**AAAGCCATTGCTAATGAATGCCAGGCCAACTTCATC**
 521 -G--C--G--K--T--L--L--A--K--A--I--A--N--E--C--Q--A--N--F--I--
 1621 TCCATCAAGGGT**CCTGAGCTGCTCACCATGTGGTTTGGGGAGTCTGAGGCCAATGTCAGA**
 541 -S--I--K--G--P--E--L--L--T--M--W--F--G--E--S--E--A--N--V--R--
 1681 GAAATCTTT**GACAAGGCCCGCCAAGCTGCCCCCTGTGTGCTATTCTTTGATGAGCTGGAT**
 561 -E--I--F--D--K--A--R--Q--A--A--P--C--V--L--F--F--D--E--L--D--
 1741 TCGATTGCC**AAGGCTCGTGGAGGTAACATTGGAGATGGTGGTGGGCTGCTGACCGAGTC**
 581 -S--I--A--K--A--R--G--G--N--I--G--D--G--G--G--A--A--D--R--V--
 1801 ATCAACCAGAT**CTGACAGAAATGGATGGCATGTCCACAAAAA**AAATGTGTT**CATCATT**
 601 -I--N--Q--I--L--T--E--M--D--G--M--S--T--K--K--N--V--F--I--I--
 1861 GGC**GCTACC**AACCGG**CCTGACATCATTGATCCTGCCATCCTCAGACCTGGCCGTCTTGAT**
 621 -G--A--T--N--R--P--D--I--I--D--P--A--I--L--R--P--G--R--L--D--
 1921 CAG**CTCATC**TACATC**CCACTTCCTGATGAGAAGTCCCGTGTTGCCATCCTCAAGGCTAAC**
 641 -Q--L--I--Y--I--P--L--P--D--E--K--S--R--V--A--I--L--K--A--N--
 1981 CTGCGCAAG**TCC**CA**GTG**CC**AAGGATGTGGACTTGGAGTTCCTGGCTAAAATGACTAAT**
 661 -L--R--K--S--P--V--A--K--D--V--D--L--E--F--L--A--K--M--T--N--
 2041 GGCTTCTCT**GGAGCTGACCTGACAGAGATTGCCAGCGTGCTTGCAAGCTGGCCATCCGT**
 681 -G--F--S--G--A--D--L--T--E--I--C--Q--R--A--C--K--L--A--I--R--
 2101 GAATCCATC**GAGAGTGAGATTAGGCGAGAACGAGAGAGGCAGACA**AA**CCATCAGCCATG**
 701 -E--S--I--E--S--E--I--R--R--E--R--E--R--Q--T--N--P--S--A--M--
 2161 GAGGTAGAAG**GAGGATGATCCAGTGCCTGAGATCCGTCGAGATCAC**TTTGAAG**AAGCCATG**
 721 -E--V--E--E--D--D--P--V--P--E--I--R--R--D--H--F--E--E--A--M--
 2221 CGCTTTT**GC**CGCG**CGTTCTGT**CAGT**GACAATGACATT**CGGAAGTAT**GAGATGTTTGCCAG**
 741 -R--F--A--R--R--S--V--S--D--N--D--I--R--K--Y--E--M--F--A--Q--
 2281 ACC**CTT**CAG**CAGAGTCGGGGCTTTGGCAGCTT**CAGATT**CC**TT**CAGGGAAC**CAGGGT**GGA**

761 -T--L--Q--Q--S--R--G--F--G--S--F--R--F--P--S--G--N--Q--G--G--
 2341 GCTGGCCCCAGTCAGGGCAGTGGAGGCGGCACAGGTGGCAGTGTATACACAGAAGACAAT
 781 -A--G--P--S--Q--G--S--G--G--G--T--G--G--S--V--Y--T--E--D--N--
 2401 GATGATGACCTGTATGGCTAA
 801 -D--D--D--L--Y--G--*-

Anexo 4 - Trabalhos apresentados publicamente durante este projecto (apresentações em poster)

Aceite para apresentação em forma de poster na 15ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Genética Humana (Lisboa, 10-12 de Novembro de 2011)

NOVEL SPLICING MUTATION IN EXON 7 (c.811 + 2 T>C) IN VCP GENE IN A PORTUGUESE PATIENT WITH CLINICAL FEATURES OF FRONTOTEMPORAL DEMENTIA

Peixoto S^{1,5}, Costa A², Velon A², Pinto-Basto J^{1,3,4}, Sequeiros J^{1,3,4}

¹CGPP, IBMC, Porto; ²Serviço de Neurologia, Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, EPE; ³UnIGENE, IBMC, Porto; ⁴ICBAS, Universidade do Porto. ⁵Secção Autónoma de Ciências da Saúde, Universidade de Aveiro.

Frontotemporal dementia (FTD) is the second most common form of dementia in individuals over age 65 years. FTD is an autosomal dominant disorder caused by frontotemporal cerebral atrophy, covering a heterogeneous group of sporadic and familial neurodegenerative diseases. The common presentation is an early change in personality and social behavior, and language dysfunction. Nowadays, several genes have been implicated, although the majority of FTD patients described present mutations in the microtubule associated protein tau (*MAPT*) and progranulin (*PGRN*) genes (17q21-22). To the best of our knowledge, only 2 Portuguese patients with a confirmed molecular diagnosis have been reported in the literature so far, and the prevalence of this disease is still unknown.

We performed mutation analysis of *MAPT*, *PGRN* and *VCP* genes, by PCR amplification of all exons and flanking intronic regions, followed by bidirectional direct sequencing in a 62 year old female patient with history of progressive cognitive decline, behavior changes (sometimes disinhibited and aggressive). No family history was not possible to obtain.

This mutation screening identified 32 sequence variations, 3 of them novel intronic variants: c.811 + 2 T > C (intron 7), c.1360-14 C>G (intron 11) and c.2160+32 A>G (intron 15). A bioinformatics approach is presented in the determination of pathogenicity of these variants.

The molecular diagnosis of FTD is important for confirmation of clinical diagnosis and, even more importantly, for the purpose of genetic counseling: once the disease-causing mutation is identified in a proband, presymptomatic testing may be offered.

INTRODUCTION

Frontotemporal dementia (FTD) is the second most common form of dementia in individuals under the age of 65 years. FTD is an autosomal dominant disorder, caused by frontotemporal cerebral atrophy, covering a heterogeneous group of sporadic and familial cases. The common presentation is an early change in personality and social behavior, and language dysfunction. Several genes have been implicated, although the majority of FTD patients described present mutations in the microtubule associated protein tau (*MAPT*) and granulin (*PGRN*) genes (17q21-22). To the best of our knowledge, only two Portuguese patients with a confirmed molecular diagnosis have been reported in the international literature so far, and the prevalence of this disease in Portugal is still unknown.

We aimed at contributing to the characterization of the mutational spectrum of FTD in Portuguese patients.

PATIENT & METHODS

We performed mutation analysis of the *MAPT* (NM_001123066.3), *PGRN* (NM_002087.2) and *VCP* (NM_007126.3) genes, by PCR amplification of all exons and flanking intronic regions, followed by bidirectional direct sequencing, in a 62 years-old female patient, with no family history of FTD, and very atypical clinical signs: progressive cognitive decline, behavioral changes (obsessive and aggressive behavior, occasional disinhibition), memory changes, and muscular atrophy.

A NOVEL SPLICING MUTATION IN EXON 7 (c.811 + 2 T>C) IN THE *VCP* GENE, IN A PATIENT WITH CLINICAL FEATURES OF FRONTOTEMPORAL DEMENTIA

RESULTS & DISCUSSION

1. Novel *VCP* variant c.811+2 T>C (intron 7) found in a patient with clinical signs of FTD

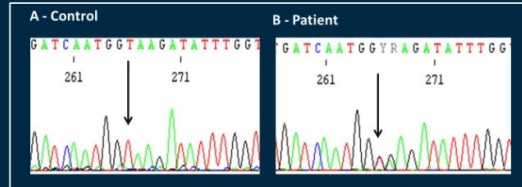


Fig 1. Identification of the intronic variation c.811+2 T>C (intron 7) on *VCP* gene by DNA sequencing. A - Electropherogram showing the c.811+2 position in a control individual; B - Electropherogram showing the heterozygous c.811+2 variation in the patient.

2. Bioinformatic analysis of c.811+2 T>C in *VCP* gene



Fig 2. Bioinformatics analysis of the c.811+2 T>C variation in *VCP* using different bioinformatic tools predicting pathogenicity (image from Alamut software).

The mutation analysis in this patient identified 32 sequence variations, 3 of them being novel intronic variants in *VCP* gene: c.811+2 T>C (intron 7), c.1360-14C>G (intron 11) and c.2160+32A>G (intron 15). For the last two variants mentioned, the bioinformatic analysis conclude to be benign. For the c.811+2 T>C variant the SpliceSite Finder-like, MaxEntScan, NNSPLICE, Human Splicing Finder (Fig. 2) and Mutation Taster all predicted that this variant is probably pathogenicity.

CONCLUSIONS

- All bioinformatic tools used predicted that the c.811+2 T>C variant is probably pathogenic. Nevertheless, it would be interesting to test the patient's parents (and eventually siblings) to ascertain if it is a *de novo* or familial variant. Also, we plan to assess the RNA consequence of this mutation.
- The phenotypic spectrum of FTD caused by *VCP* mutations is still incompletely defined. This description contributes to broaden the phenotypic spectrum of this disease.
- The molecular diagnosis of FTD is important for confirmation of its clinical diagnosis and, even more importantly, for the purpose of genetic counseling of patients and at-risk relatives.

Aceite para apresentação em forma de poster na 16ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Genética Humana (Porto, 22-24 de Novembro de 2012)

Molecular Diagnosis of frontotemporal dementia in Portuguese patients

Peixoto S¹, Pinto-Basto J^{1,2,3}, Sequeiros J^{1,2,3}

¹CGPP, IBMC, Porto; ²UnIGENE, IBMC, Porto; ³ICBAS, Univ. Porto

Frontotemporal dementia (FTD) is the second most common form of dementia in individuals under age 65 years. FTD is an autosomal dominant disorder, caused by frontotemporal cerebral atrophy, covering a heterogeneous group of sporadic and familial cases. The common presentation is an early change in personality and social behavior, and language dysfunction. Several genes have been implicated, although most FTD patients present mutations in the microtubule associated protein tau (*MAPT*) and granulin (*GRN*) genes (17q21-22). The prevalence of this disease in Portugal is still unknown.

We performed mutation analysis of *MAPT* and *GRN*, by PCR amplification of all exons and flanking intronic regions, followed by bidirectional direct sequencing, and MLPA analysis whenever appropriate, in a group of 52 Portuguese patients with a clinical diagnosis of FTD. Mutation screening of *VCP* is ongoing (26 patients already screened).

No pathogenic mutations described in the literature were found. Instead, several novel nucleotide variants were found in *MAPT* (c.1561+165 G>A, c.1827+15 C>T, c. c.1561+119 G>A) and *VCP* (c.811+2T>C, c.351G>T, 2160+32A>G) genes. A bioinformatics approach was performed to determine the pathogenicity of these variants, suggesting all but one are probably benign. The mutation c.811+2T>C in the *VCP* gene is probably pathogenic, as it is predicted to disrupt the splicing consensus of exon 7.

The molecular diagnosis of FTD is important for confirmation of its clinical diagnosis and, even more importantly, for the purpose of genetic counseling of at-risk relatives.

INTRODUCTION

Frontotemporal dementia (FTD) is the second most common form of dementia in persons under age 65 years.

This is an AD disorder, causing frontotemporal atrophy, in a heterogeneous group of isolated and familial cases.

Common presentation is early changes in personality and social behavior, and language dysfunction.

Several genes have been implicated, although most patients present mutations in the microtubule associated protein tau (*MAPT*) and granulin (*GRN*) genes.

Prevalence of FTD in Portugal is still unknown.

PATIENTS & METHODS

We performed mutation analysis of the *MAPT* (NM_001123066.3), *GRN* (NM_002087.2) genes, by PCR amplification of all exons and flanking intronic regions, followed by bidirectional direct sequencing, and MLPA analysis whenever appropriate, in a group of 52 Portuguese patients with a clinical diagnosis of FTD. Mutation screening of *VCP* (NM_007126.3) is ongoing (26 patients already screened).

Molecular Diagnosis of Frontotemporal Dementia in Portuguese Patients

RESULTS

1. Mutation screening of *MAPT*, *GRN* and *VCP* genes

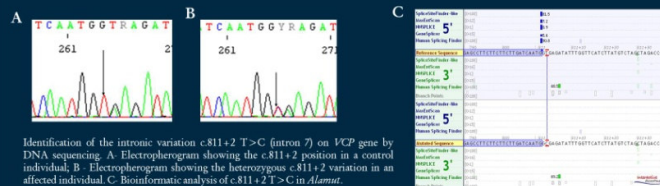
None of the pathogenic mutations described in the literature could be found. Instead, several novel nucleotide variants were seen in *MAPT* (c.1561+165 G>A, c.1827+15 C>T, c. c.1561+119 G>A) and *VCP* (c.811+2T>C, c.351G>T, 2160+32A>G) genes. A bioinformatics analysis suggested that all but one were probably benign.

Mutation c.811+2T>C in *VCP* is probably pathogenic, as it was predicted the loss of the 5' splice donor site by disrupting the GU consensus sequence. It was not possible to access relatives members for segregation studies; mRNA studies were not yet performed to determine the effect of this variant at that level. It is expected, however, that intron 7 will be incorporated in the protein, originating a truncated protein.

This mutation was found in a 62 year-old female, with no family history, and very atypical clinical signs: progressive cognitive decline, behavioral changes (obsessive behavior, occasional disinhibition and aggressiveness), memory changes, and muscular atrophy.

List of novel variants found in this study.

Gene	DNA	Protein	Exon/Intron	Patient	Bioinformatics prediction	
					Alamut 2.7	MutationTaster
<i>MAPT</i>	c.1561+119 G>A	-	In10	DF152	benign	benign
	c.1561+165 G>A	-	In10	DF129	benign	benign
	c.1827+15 C>T	-	In11	DF134	benign	benign
	c.351G>T	-	Ex4	DF125	benign	benign
<i>VCP</i>	c.811+2T>C	-	In7	DF113	pathogenic	pathogenic
	2160+32A>G	-	In15	DF113, DF115	benign	benign



2. MLPA analysis of *MAPT* and *GRN* genes

No CNVs were found in this cohort of Portuguese patients with a clinical diagnosis of FTD. All samples showed values between 0.75-1.25, indicating that these patients had a normal number of copies of these 2 genes. The rearrangements in *MAPT* and *GRN* genes do not seem to be the cause FTD in these patients.



CONCLUSIONS

- We describe the first Portuguese patient with a *VCP* mutation.
- Although screening of the *VCP* is still ongoing, results seem to indicate that known point mutations in *MAPT*, *GRN* and *VCP* and CNVs in *MAPT* and *GRN* genes are not a major cause of FTD in Portuguese patients.
- Molecular diagnosis of FTD is important to confirm a clinical diagnosis and for genetic counseling of at-risk relatives.